

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur präbiotischen Entstehung von
Purin-Nukleosiden
und
Totalsynthese von natürlichen 7-Desaza-RNA-Modifikationen**

Ines Daniela Thoma

aus

Dachau, Deutschland

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung der LMU vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 05.05.2014



Ines Thoma

Dissertation eingereicht am: 12.05.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder

Mündliche Prüfung am: 21.07.2014

Da hab' ich was Eigenes.

Frau Hoppenstedt

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die Möglichkeit danken, meine Dissertation über diese spannenden Themen unter seiner Leitung durchzuführen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die gewährte wissenschaftliche Freiheit haben wesentlich dazu beigetragen, diese Themen zu bewältigen.

Frau *Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder* möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken, sowie allen weiteren Kommissionsmitgliedern für ihre Teilnahme.

Frau *Slava Gärtner* möchte ich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten danken. *Herrn Dr. David Stephenson* und Frau *Claudia Dubler* danke ich für die Aufnahme meiner NMR-Spektren, auch wenn es mal ein bisschen zu wenig Substanz war. *Herrn Dr. Werner Spahl* und Frau *Sonia Kosak* möchte ich für die zahlreichen Messungen am Massenspektrometer bedanken.

Frau *Sabine Voß* möchte ich für die Hilfe bei der Synthese von m^2A und für ihre Mühen danken, die Ordnung im Arbeitskreis aufrecht zu halten.

Meinem *Bench-Nachbarn Dr. Peter Thumbs* möchte ich für die angenehme Zeit, die fruchtbaren Diskussionen und die hervorragenden Erträge seines Gartens danken. *Jessica Steinbacher* möchte ich danken, dass sie mir im letzten Promotionsjahr ebenfalls eine ausgezeichnete *Bench-Nachbarin* war.

Dr. Markus Müller, Dr. Peter Thumbs, Michael Ehrlich, Thomas Wildenhof, Toni Pfaffeneder und *Stefan Schießler* danke ich für ihr gewissenhaftes Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Daniel Globisch und *Dr. Tobias Brückl* danke ich für die Bereitstellung der natürlichen Proben von Schwein und Bakterien, sowie das Einarbeiten in das Thema der tRNA Nukleoside und der Massenspektrometrie. Bei *Dr. Tim Gehrke* bedanke ich mich für die motivierenden ersten Ergebnisse auf dem Präbiotik-Projekt. Tatkräftige Unterstützung in der Synthese habe ich von *Tobias Raisch, Sebastian Rappenglück, Miriam Wallner, Michael Ehrlich* sowie *Amrei Deutsch* erhalten.

Meinen Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich danke allen, die meine Musikauswahl unterstützt oder toleriert haben. *Dorothea Matschkal, Dr. Emine Kaya, Sabine Voß, Sandra Koch* und *Dr. Veronika Reiter* möchte ich für die erholsamen Gackerpäuschen danken. Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die kollegiale und unterhaltsame Atmosphäre.

Mein herzlichster Dank geht an meinen Freund *Toni Pfaffeneder*: Für das wunderbare Philosophieren über alles Mögliche, dass er mich stets auf andere Gedanken bringen kann und mich in emotional fordernden Phasen festhält.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern *Silvia* und *Dieter Thoma* und meiner Schwester *Dr. Marisa Petri* danken, die immer für mich da waren und mir, mit ihrem tiefen Gottvertrauen in meine Handlungen, immer Halt geben können.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

Ines Thoma und Thomas Carell, Total Synthesis of the Hypermodified tRNA Nucleoside Epoxyqueuosine, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4483–4485.

Thomas Carell, Catarina Brandmayr, Antje Hienzsch, Markus Müller, Davis Pearson, Veronika Reiter, Ines Thoma, Peter Thumbs, Mirko Wagner, Structure and Function of Noncanonical Nucleobases, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 7110–7131.

Tobias Brückl, Ines Thoma, Andreas J. Wagner, Paul Knochel, Thomas Carell, Efficient Synthesis of Deazaguanosine derived tRNA Nucleosides PreQ₀, PreQ₁, and Archaeosine using the Turbo Grignard Method, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 34, 6517–6519.

Weitere Publikationen

Catarina Brandmayr, Mirko Wagner, Tobias Brückl, Daniel Globisch, David Pearson, Andrea C. Kneuttinger, Veronika Reiter, Antje Hienzsch, Susanne Koch, Ines Thoma, Peter Thumbs, Stylianos Michalakis, Markus Müller, Martin Biel, Thomas Carell, Isotope-Based Analysis of Modified tRNA Nucleosides Correlates Modification Density with Translational Efficiency, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 11162–1165.

Daniel Globisch, David Pearson, Antje Hienzsch, Tobias Brückl, Mirko Wagner, Ines Thoma, Peter Thumbs, Veronika Reiter, Andrea Christa Kneuttinger, Markus Müller, Stephan A. Sieber, Thomas Carell, System-Based Analysis of Modified tRNA Bases, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 9739–9742.

Thomas Klapötke, Jörg Stierstorfer, Karina Tarantik, Ines Thoma, Strontium Nitriminotetrazolates - Suitable Colorants in Smokeless Pyrotechnic Compositions, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2008**, 634, 2777–2784.

Konferenzbeiträge

Ines Thoma, Tim Gehrke, Thomas Carell, Stalking Purine Nucleoside Formation, Posterpräsentation: *SFB 749-Tagung*, **2012**, Wildbad Kreuth, Deutschland.

Ines Thoma, Tobias Brückl, Thomas Carell, Total Synthesis of Hypermodified Deazaguanosine Nucleosides, Posterpräsentation: *17th European Symposium of Organic Chemistry*, **2011**, Kreta, Griechenland.

Ines Thoma, Daniel Globisch, Tobias Brückl, Thomas Carell, Synthesis of the tRNA nucleosides Queuosine Q and N⁶-threonylcarbamoyladenine t⁶A, Vortrag: *3rd EuCheMS Chemistry Congress*, **2010**, Nürnberg, Deutschland.

1	ZUSAMMENFASSUNG	I
2	ABSTRACT	V
3	PRÄBIOTIK – CHEMISCHE EVOLUTION	1
3.1	Die ersten präbiotischen Erkenntnisse.....	1
3.1.1	Formose-Reaktion	1
3.1.2	Urey-Miller-Experiment	3
3.2	Nukleobasen.....	4
3.2.1	Präbiotische Bildungswege von Pyrimidinen.....	5
3.2.2	Präbiotische Bildungswege von Purinen	6
3.2.3	Präbiotische Bildungswege von Purinen und Pyrimidinen	7
3.3	Nukleoside.....	7
3.3.1	Präbiotische Bildungswege von Pyrimidin-Nukleosiden	7
3.3.2	Präbiotische Bildungswege von Purin-Nukleosiden	9
3.4	RNA Assemblierung	9
3.4.1	RNA-Welt-Hypothese	9
3.4.2	Alternativen zur Furanose-RNA	10
3.4.3	Oligomerisierung	11
4	PRÄBIOTISCHE SYNTHESE VON PURIN-NUKLEOSIDEN	14
4.1	Aufgabenstellung.....	14
4.2	Methodik der präbiotischen Messungen	15
4.3	Präbiotische Ansätze mit FaPyA (2).....	17
4.3.1	Darstellung von Adenosin.....	17
4.3.2	Darstellung von Adenosin unter Formose-ähnlichen Bedingungen	21
4.3.3	Präbiotische Darstellung der Tetrosederivate von Adenosin	22
4.4	Präbiotische Ansätze mit FaPyG und Analoga	23
4.4.1	Darstellung von Guanosin und Nebularinanaloga	24
4.4.2	Darstellung von Guanosin und Nebularinanaloga unter Formose-ähnlichen Bedingungen	27
4.5	Imidazolringöffnung	29
4.6	Synthesen	31
4.6.1	Synthesen der Formamidopyrimidine (FaPys).....	31
4.6.2	Glykosylierung	33
4.6.3	Synthese von β -Pyranosyladenosin β -pA (5)	33
4.6.4	Synthese von β -Pyranosylguanosen β -pG (14)	33
4.6.5	Synthese der β -2,6-Diaminonebularinderivate β -fDN (46) und β -pDN (17).....	35
4.6.6	Synthese von β -Pyranosylnebularin β -pN (22)	36
4.7	Ausblick	37

5	RIBONUKLEINSÄURE – RNA	38
5.1	RNA-Modifikationen	38
5.2	Transfer-RNA, tRNA	40
5.3	<i>Wobble</i> -Position	41
5.4	7-Desazamodifikationen	42
5.5	Q in Bezug auf Krankheiten	44
6	SYNTHESE UND UNTERSUCHUNGEN VON TRNA MODIFIKATIONEN	46
6.1	Aufgabenstellung.....	46
6.2	Synthese von hypermodifizierten 7-Desazaguanosinderivaten.....	47
6.2.1	Synthese von Epoxyqueuosin oQ (35)	47
6.2.2	Synthese von der Hypermodifikation preQ1 (37).....	51
6.2.3	Synthesestudien zur Hypermodifikation Glutamyl-Queuosin gluQ (36)	52
6.2.4	Synthese von Cyclopenten 42.....	54
6.3	Synthese von 2-Methyladenosin m ² A (34)	55
6.4	Messungen zu den Hypermodifikationen galQ und manQ	56
6.5	Ausblick	60
7	EXPERIMENTELLER TEIL	61
7.1	Material und Methoden	61
7.2	Synthese der Formamido-Edukte.....	65
7.2.1	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FaPyA, 2) ⁸¹	65
7.2.2	2,4-Diamino-6-oxo-5-formamidopyrimidin (FaPyG, 13) ⁸²	66
7.2.3	2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin (FaPyDN, 16) ⁸³	66
7.2.4	4-Amino-2,6-dihydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPyX, 15)	67
7.3	Synthese der Referenzverbindungen für präbiotische Koinjektions-Experimente.....	68
7.3.1	Synthese von β -pA (5) und β -pN (22)	68
7.3.2	Synthese von β -pG (14)	72
7.3.3	Synthese von β -fDN (9).....	74
7.3.4	Synthese von β -pDN (17).....	76
7.4	Präbiotische Syntheseansätze.....	79
7.4.1	Reaktionsbedingungen der präbiotischen Synthese von Adenosin und Adenosinderivaten	79
7.4.2	Reaktionsbedingungen der präbiotischen Synthese von Guanosin und Guanosinderivaten	81
7.4.3	Reaktionsbedingungen präbiotischer Synthesen unter formoseähnlichen Bedingungen	82
7.5	Synthese der hypermodifizierten 7-Desazaguanosinderivaten	84
7.5.1	Synthese von 7-Desazaguanosinaldehyd 48 ^{141,145}	84
7.5.2	Synthese von Epoxid 43 ^{115,149}	89

7.5.3	Synthese von Epoxyqueuosin (oQ, 35) ¹¹⁵	92
7.5.4	Synthese von preQ1 (37) ¹⁴⁵	95
7.5.5	Synthese zu Glutaryl-Queuosin (36)	97
7.5.6	Synthese von Cyclopenten 52.....	100
7.5.7	Synthese von Aminosäure 54	102
7.5.8	Synthese von Cyclopenten 42 ^{149,155,166,167}	104
7.6	Synthese von m²A (34)¹⁰⁴	111
7.6.1	6-Chlor-2-iod-9-(2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9 <i>H</i> -purine (66) ¹⁶⁸	111
7.6.2	6-Chlor-2-iod-9-(2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9 <i>H</i> -purine (67) ¹⁶⁹	112
7.6.3	6-Chlor-2-iod-9-(2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9 <i>H</i> -purin (34) ^{170,171}	112
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
9	LITERATURVERZEICHNIS	116

1 Zusammenfassung

Die Fragestellungen der Präbiotik beschäftigen sich mit dem Rätsel der chemischen Evolution. Obwohl auf diesem Gebiet schon seit vielen Jahren geforscht wird, ist noch vieles unverstanden. Die zentrale Frage, wie die Nukleinsäure-Bausteine entstanden sein könnten, wurde in dieser Arbeit aufgegriffen. Ein Kernproblem stellt die Glykosylierung der Purinbasen mit Ribose dar, welche unter wässrigen Bedingungen bislang nicht beobachten werden konnte. In dieser Arbeit wurde ein Ansatz über die Bildung einer Schiff'schen Base (Abbildung 1) gewählt. Als treibende Kraft dient eine intramolekulare Zyklisierung welche eine Rearomatisierung ermöglicht. Auf diese Weise konnten Adenosin (A), Guanosin (G) und darüber hinaus die Purin-Derivate Inosin, 2,6-Diaminonebularin, 2-Aminonebularin und Nebularin auf präbiotischem Weg dargestellt werden. Zur Identifizierung und Zuordnung der Reaktionsprodukte wurde ein Koinjektions-Verfahren über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) angewendet. Hierfür wurden Furanosyl- und Pyranosyl-Nukleoside als Referenzverbindungen benötigt, welche synthetisch dargestellt werden mussten. Ebenso wurden Formamidopyrimidine (FaPy) als Ausgangsmaterial für die präbiotischen Reaktionen benötigt und synthetisiert.

Mittels eines *Screenings* verschiedener Bedingungen wurde festgestellt, dass die besten Umsatzbedingungen verschiedener FaPys mit Ribose durch unterschiedliche Salzzusätze erhalten wurden (siehe Einschub links unten in Abbildung 1). So war im Fall von Adenosin kein Salz notwendig, um eine saubere Umsetzung zu beobachten. Die Reaktion zu Guanosin verlief im direkten Vergleich deutlich schlechter und konnte nur mit spezifischen Salzen, wie z.B. $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ oder CaCO_3 , realisiert werden. Die Bildung der Pyranoseform statt der Furanoside war meist effizienter, was thermodynamisch erklärt werden kann.

Zusätzlich konnte die präbiotische Glykosylierung an eine Formose-Reaktion gekoppelt werden, bei der Ribose zuerst aus einfachen C_1 -, C_2 - und C_3 -Bausteinen aufgebaut wird. So konnte unter Formose-ähnlichen Bedingungen ebenfalls ein Umsatz zu den gewünschten Nukleosiden detektiert werden. Neben der Entstehung der Ribonukleoside konnten auch Tetrosenukleoside detektiert werden.

Auf diesem neuen präbiotischen Weg können die Purin-Nukleoside Adenosin, Guanosin, Inosin, 2,6-Diaminonebularin, Nebularin und 2-Aminonebularin erstmals erfolgreich im wässrigen Milieu erhalten werden.

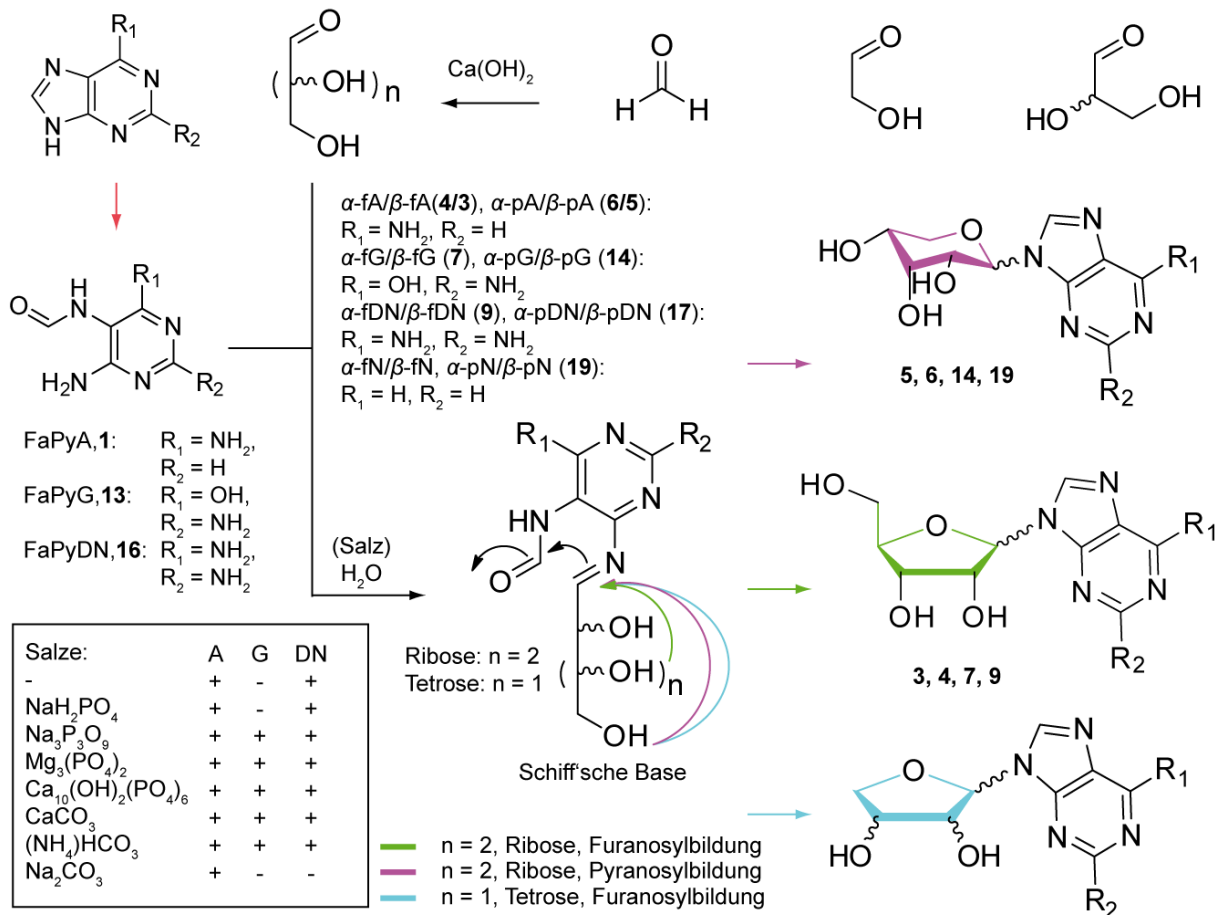


Abbildung 1: Der Ansatz der präbiotischen Reaktion über Formamidopyrimidine (FaPy). Die Imidazolringöffnung von den Nukleobasen zu den FaPy wird durch einen roten Pfeil dargestellt. Nach der Reaktion der Ribose mit einem FaPy wird zunächst das Imin gebildet. Dieses kann entweder zur Pyranose ($n=2$, lila) oder zur Furanose ($n=2$, grün) weiter reagieren. Im Fall der Formose-Reaktion können auch die Tetrosenukleoside ($n=1$, blau) entstehen. A = Adenosin, G = Guanosin, DN = 2,6-Diaminonebularion.

Natürliche Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) besteht hauptsächlich aus den vier kanonischen Nukleosiden Adenosin (A), Guanosin (G), Cytidin (C), Uridin (U) und darüber hinaus aus über 100 modifizierten Nukleosiden. Die Basen der Transfer-RNA (tRNA) liegen etwa zu 20% modifiziert vor. Bislang sind um die 90 Modifikationen bekannt, welche sich in der tRNA befinden können. Eine der interessantesten hypermodifizierten Nukleoside ist das 7-Desazaguanosin Queuosin (Q). Q befindet sich stets an der *Wobble*-Position (Position 34) und ist somit für die Kodondegenerierung mitverantwortlich. So können tRNAs mit Q an der *Wobble*-Position Kodons auf der *messenger*-RNA (mRNA) mit der Sequenz NAC und NAU erkennen (N steht für A, G, C oder U). Eine tRNA mit G statt Q kann hingegen lediglich Kodons lesen welche auf C enden. Eukaryoten können Q nicht *de novo* herstellen und sind somit von der Biosynthese der Prokaryoten abhängig. Die direkte Vorstufe von Q ist Epoxyqueuosin (oQ, Abbildung 2). Bislang wurde weder die postulierte Struktur bewiesen, noch eine potentielle Synthese veröffentlicht.

Die Synthese von oQ wurde in dieser Arbeit basierend auf einer im Arbeitskreis Carell entwickelten Synthese von Q durchgeführt. Das Epoxyamin **43** konnte in 13 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 25% erhalten werden. Durch den Gebrauch der sperrigen TBS-Schutzgruppen konnte das Epoxid mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) in der gewünschten Konfiguration realisiert werden. Die *Stille*-ähnliche CO-Insertion konnte unter Druck auf 91% verbessert werden. Nach der reduktiven Aminierung konnte das vollgeschützte oQ in einem Schritt komplett entschützt werden. So wurde oQ in 22 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 0.9% erhalten (Abbildung 2).

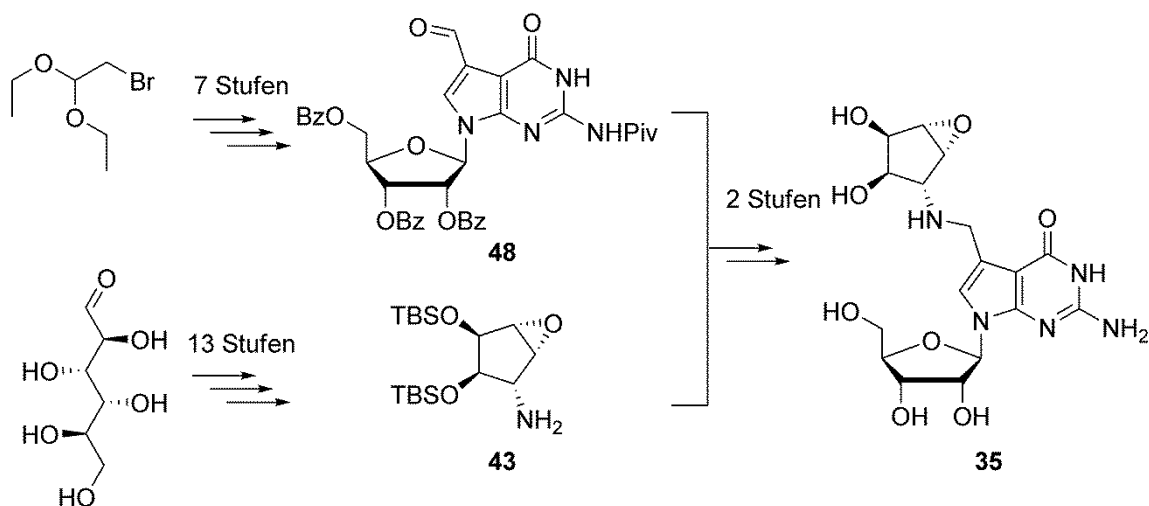


Abbildung 2: Totalsynthese des hypermodifizierten Nukleosids Epoxyqueuosin oQ. Ausgehend von Bromacetaldehyddiethylacetal wurde der Aldehyd **48** in sieben Stufen synthetisiert. In einer Synthese über 13 Stufen wurde ausgehend von Mannose das Epoxyamin **43** erhalten. Der Aldehyd **48** und das Epoxyamin **43** ergaben nach reduktiver Aminierung und Entschützung Epoxyqueuosin.

Zur Identifizierung und Strukturcharakterisierung des natürlichen Nukleosids wurde neben NMR und Massenspektrometrie auch ein Koinjektions-Experiment mittels HPLC-MS durchgeführt. Hierfür wurde tRNA aus *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert, enzymatisch auf Nukleosidebene verdaut und die natürliche Probe zusammen mit dem synthetischen Produkt koinjiziert. Es war lediglich ein Peak zu beobachten, weshalb davon auszugehen ist, dass das natürliche oQ, mit dem Epoxid cis zur Aminogruppe, synthetisiert wurde. Somit konnte die Stereochemie von oQ klargestellt werden.

Ebenso konnte eine verbesserte Syntheseroute zu einem weiteren Biosynthesevorläufer, dem preQ₁ ausgearbeitet werden. Hierbei wurde Nukleosid **47** über Aldehyd **48** mit Hydroxylamin zum entsprechenden Oxim **50** umgesetzt. Die darauf folgende Reduktion und Entschützung ergab preQ₁ in 2.1% über 9 Stufen.

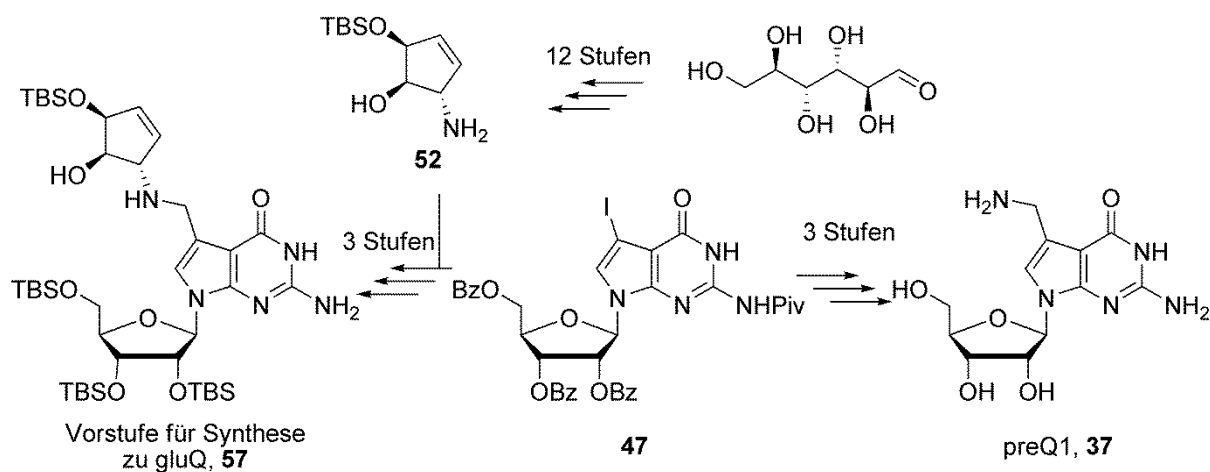


Abbildung 3: Synthese zu den weiteren Queuosin-Derivaten preQ₁, einer Biosynthesevorstufe von Q, und der synthetischen Vorstufe der natürlichen Hypermodifikation gluQ.

Daneben wurde eine Syntheseroute zu Glutamyl-Queuosin entwickelt. Die Struktur des Glutamyl-Derivates ist bislang noch nicht aufgeklärt. Die Synthese wurde im Rahmen dieser Arbeit bis zu dem in Abbildung 3 dargestellte Nukleosid durchgeführt.

2 Abstract

Prebiotic chemistry addresses the question of chemical evolution. Although there have been numerous discoveries on this subject, a lot of unresolved issues still remain. This thesis is focused on the question of how the nucleoside building blocks of life could have evolved. A central problem is the glycosylation of the purine bases with ribose, which was so far not observed under aqueous conditions. In this thesis, an approach using the formation of a Schiff base was chosen (Figure 1). The driving force is the intramolecular cyclization which enables rearomatization. Hereby, adenosine (A), guanosine (G) and the purine derivatives inosine, 2,6-diaminonebularin, 2-aminonebularine and nebularine were synthesized prebiotically. For identification and assignment, a co-injection process via high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) was performed. Therefore, furanosyl- and pyranosyl-nucleosides, which had to be synthesized, were required as co-injection standards. Moreover, formamidopyrimidines (FaPys) as starting materials for the prebiotic reactions were prepared.

A screening of several conditions led to the conclusion, that different FaPys require the addition of different salts to the reaction for optimal conversion yields (see parenthesis below left Figure 1). The glycosylation to adenosine needed no particular salt addition to obtain conversion. In contrast, the reaction towards guanosine is only possible in the presence of specific salts, such as $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ or CaCO_3 . Furthermore, the formation of the pyranosyl isomers was preferred over the formation of the furanosyl isomers, which is in accordance with the thermodynamic situation.

Furthermore, the glycosylation was expanded and linked to the formose reaction. Here, ribose is *in situ* constructed from simple C_1 -, C_2 - and C_3 -building blocks. Not only could the desired nucleosides be detected but also tetrose nucleosides were formed.

Thus, for the first time the purine nucleosides adenosine, guanosine, inosine, 2,6-diaminonebularine, nebularine and 2-aminonebularine were successfully synthesized prebiotically under aqueous conditions.

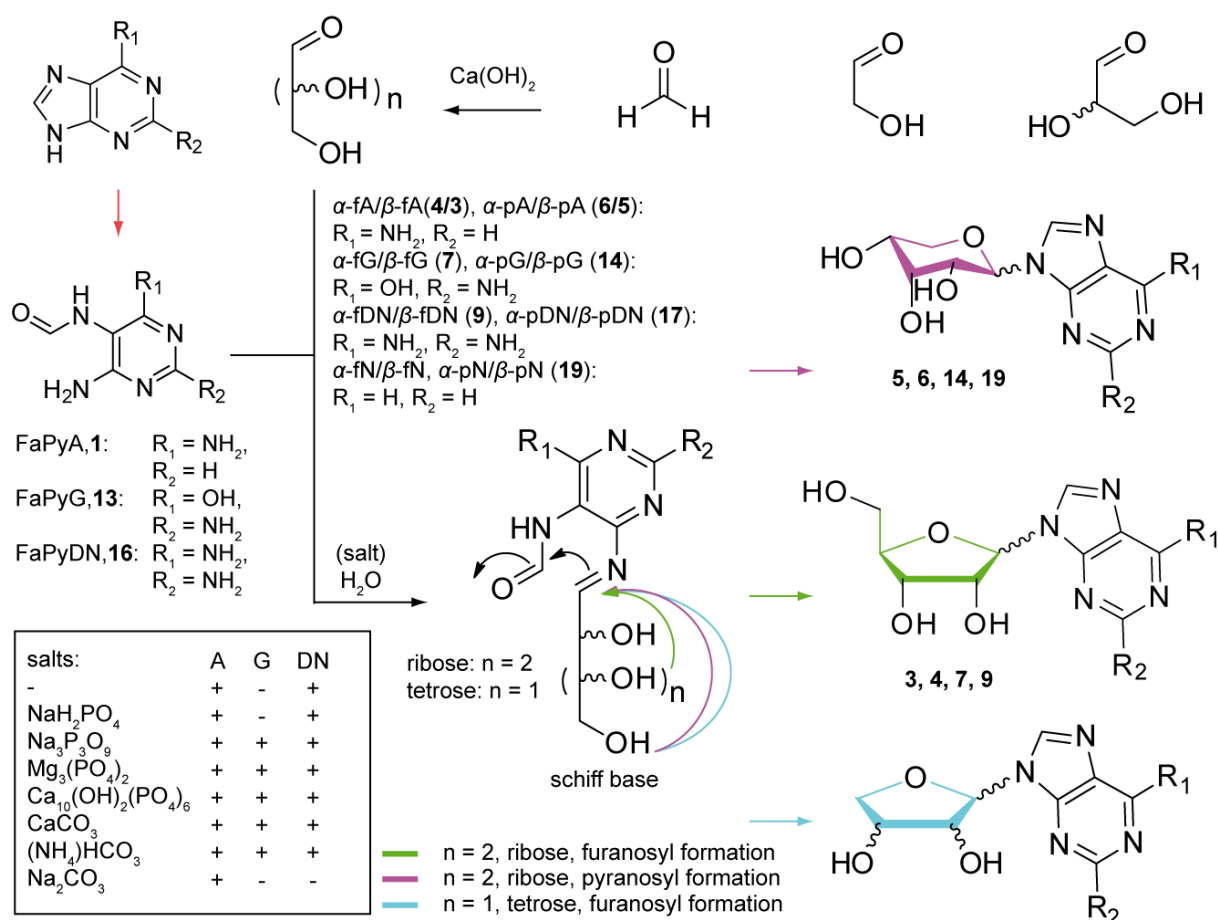


Figure 1: Approach of prebiotic nucleoside synthesis via formamidopyrimidines (FaPys). The imidazole ring opening of the nucleobases to the FaPys is illustrated with a red arrow. The reaction of the ribose with the FaPy first leads to the imine formation. After intramolecular cyclization and rearomatization, either the pyranosyl ($n=2$, violet) or the furanosyl ($n=1$, green) is formed. In case of a prefixed formose like reaction, also the tetrose nucleosides ($n=1$, blue) are formed. A = adenosine, G = guanosine, DN = 2,6-diaminonebularine.

Natural ribonucleic acid (RNA) is composed from the four canonical nucleosides adenosine (A), guanosine (G), cytidine (C), uridine (U), and over 100 modified nucleosides. The transfer-RNA (tRNA) is modified to about 20%. So far, approximately 90 modifications are known, which can be found in the tRNA. One of the most interesting hypermodified nucleosides is the 7-deazaguanosine queuosine (Q). Q is located at the *wobble*-position (position 34) and therefore it is involved in codon degeneration. Thus, tRNA that contains Q at the *wobble* position can recognize codons of the messenger-RNA (mRNA) featuring the sequences NAC and NAU (N represents A, G, C, or U). In contrast, a tRNA containing G instead of Q can only read codons ending with C . Eukaryotes cannot synthesize Q *de novo* and are consequently dependent on the biosynthesis by prokaryotes. The direct biosynthetic precursor of Q is epoxyqueuosine (oQ, Figure 2). So far, the postulated structure of oQ had never been proven, nor is a synthesis of the compound published.

The synthesis of oQ was achieved based on the synthesis of Q developed in the *Carell* group. Epoxyamine **43** was prepared in a 13 step synthesis in an overall yield of 25%. Due to the bulky *tert*-butyldimethylsilyl-protecting groups (TBS) the epoxy moiety with the desired configuration, was interceded with *meta*-chlorobenzoic acid (*m*CPBA). The *Stille*-like CO-insertion was improved under pressure to a final yield of 91%. After reductive amination the fully protected oQ was deprotected in a one-pot-reaction. Thus, oQ was obtained in 22 steps with an overall yield of 0.9% (Figure 2).

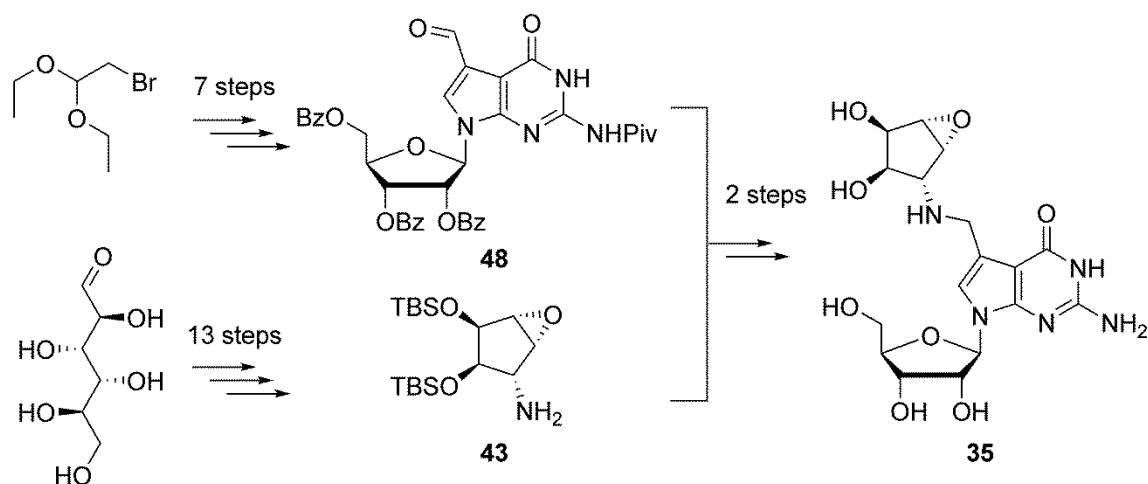


Figure 2: Total synthesis of the hypermodified nucleoside epoxyqueuosine oQ. Starting from bromoacetaldehyde diethyl acetate aldehyde **48** was obtained in seven steps. The 13 steps synthesis to epoxyamine **43** was started with aldehyde **48** and epoxyamine **43** underwent a reductive amination and after deprotection gave epoxyqueuosine.

Besides NMR and mass spectrometry, the identification of the natural nucleoside was performed using a co-injection experiment via HPLC-MS. To this end, tRNA from *Escherichia coli* (*E. coli*) was isolated and digested enzymatically to give a nucleoside mixture. The natural probes and the synthesized standard were co-injected. Only one peak was obtained, which supported NMR evidence that the natural oQ was indeed synthesized, and that the epoxy is in *cis*-position relative to the amino group. Thus, the postulated stereochemistry could be confirmed.

Furthermore, an improved synthesis of the biosynthesis precursor preQ₁ was developed. For this, aldehyde **48** was reacted with hydroxylamine to the corresponding oxime **50**. Reduction and deprotection provided preQ₁ in over 9 steps and with an overall yield of 2.1%.

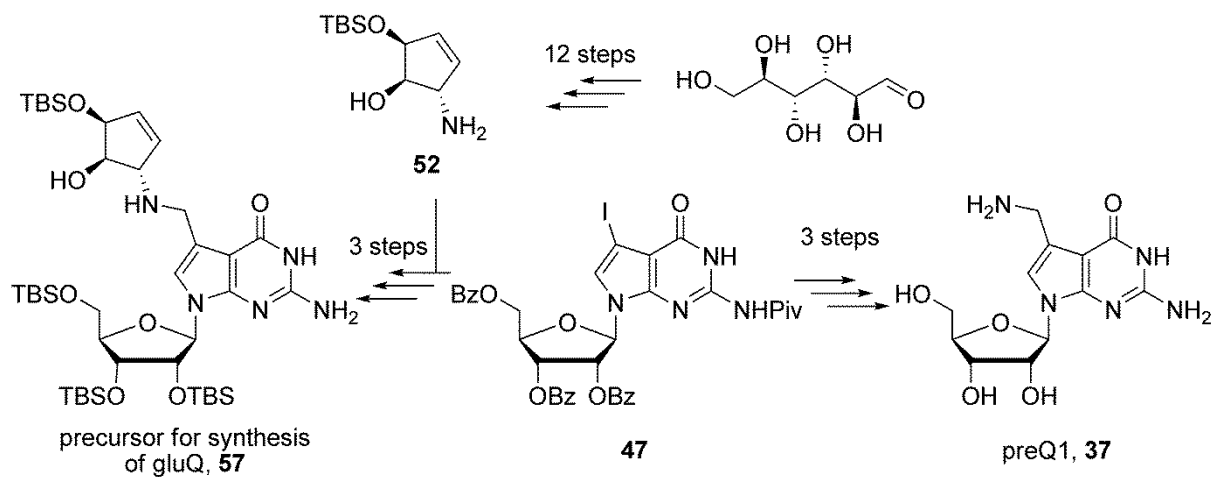


Figure 3: Synthesis towards the further queuosine-derivatives preQ1, being a biosynthesis precursor of Q and the synthetically available precursor of the natural hypermodification gluQ.

In addition, a synthesis route of glutamyl-queuosine was elaborated. The structure of the glutamyl-derivative is not yet clarified. Within this thesis the synthesis was developed up to the nucleoside depicted in Figure 3.

3 Präbiotik – Chemische Evolution

„Im Anfang schuf Gott Himmel und Erde; die Erde aber war wüst und wirr, Finsternis lag über der Urflut, und Gottes Geist schwebte über dem Wasser.“¹ Oder doch nicht?

Schon lange beschäftigt sich die Menschheit mit den Fragen: Wie ist Leben entstanden? Woher kommen die Moleküle, die Leben auf unserem Planeten ermöglichen? Was waren die ersten wichtigen Moleküle, aus denen die heute essentiellen Bausteine folgten? Wie konnten sich hochkomplexe Biopolymere bilden? Warum ist Adenosin ein natürliches Nukleosid und nicht 2-Aminonebularin? Warum gibt es vier Nukleosid-Grundbausteine und nicht mehr oder nur zwei? Viele Philosophen machen sich bis heute ihre Gedanken zu diesen Fragestellungen. In der Naturwissenschaft wird diese Fragestellung „präbiotische Chemie“ genannt.

3.1 Die ersten präbiotischen Erkenntnisse

3.1.1 Formose-Reaktion

Der chemische Startschuss in der Präbiotik ging von *Alexander Butlerov* aus. Er entdeckte 1861, dass eine Mischung aus Formaldehyd unter alkalischen Bedingungen „eine unkrystallisierbare, zuckerartige und an Süßholzsafte erinnernd schmeckende, schwach nach Caramel riechende Substanz“² ergibt. *Butlerov* hatte auf diese Weise in der Tat Zuckermoleküle hergestellt. Verschiedene Reaktionsmechanismen werden hierzu kontrovers diskutiert.³⁻⁶ Das Kernproblem stellt der Mechanismus der Primärreaktion dar, die Reaktion zweier Formaldehyde zum Glykolaldehyd. Eine Aldolkondensation ist sehr unwahrscheinlich, da lediglich ein Kohlenstoffatom zur Verfügung steht.⁷ Unter basischen Bedingungen läuft in einer Formaldehydlösung, wie in Abbildung 4a dargestellt, im Regelfall die *Cannizzaro*-Reaktion ab, wobei Ameisensäure und Methanol entsteht.⁸ Der große Nachteil der Formose-Reaktion stellt, wie in Abbildung 4b gezeigt, die nicht vorhandene Selektivität dar. Bei der Reaktion werden sämtliche Zucker (C3-C6) als komplexes Isomeren-Gemisch dargestellt. *Voelter* und Mitarbeiter erarbeiteten in einer kinetischen Studie Optimalbedingungen für die Gewinnung von Ribose. Sie vermuteten, dass Glykolaldehyd, welches zuvor in einer Primärreaktion aus Formaldehyd entstanden ist, über einen Aldolmechanismus mit sich selber oder noch vorhandenem Formaldehyd weiterreagiert. Sie konzentrierten sich in dieser Studie deshalb auf diese Sekundärreaktionen, d.h. auf die Bildung höherer Zucker nachdem Formaldehyd aufgebraucht ist.⁹

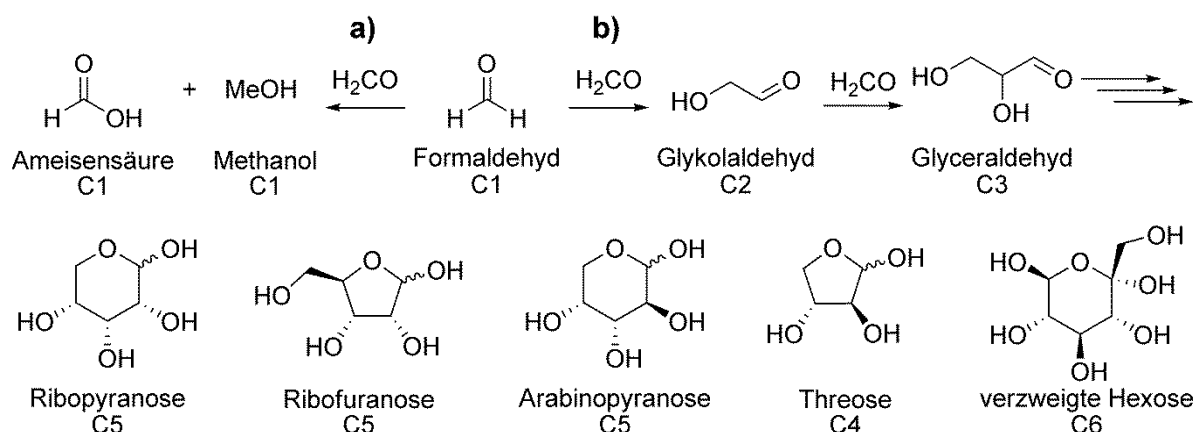


Abbildung 4: Reaktionsmöglichkeiten von Formaldehyd in basischer Lösung. **a)** Die *Cannizzaro* Reaktion führt zu Ameisensäure und Methanol. **b)** Bei der Formose-Reaktion wird ein Formaldehyd umgepol, um zum Glykonaldehyd zu gelangen. Die Vielzahl der Folgereaktionen ist so groß, dass nicht nur die gewünschte Ribose (Pyranose- und Furanose-Form) entsteht, sondern auch sämtliche Isomere und weitere komplexe Zuckermoleküle (hier nur ein paar wenige Beispiele dargestellt).

Die scheinbare Einfachheit der Formose-Reaktion motivierte zahlreiche Forschergruppen, sich mit dieser Thematik auseinander zu setzen. So stellte die Gruppe um *Benner* fest, dass bei dem Zusatz von Boraten die Bildung der Ribose präferiert wird. Dies geschieht aufgrund der Stabilisierung von cis-ständigen Alkoholen.¹⁰ *Lambert et al.* stellten ebenfalls eine Stabilisierung cis-ständiger Alkohole bei dem Gebrauch von Silicaten fest. Das Hauptprodukt hier sind jedoch Tetrosen.¹¹ Auch wenn Silikate in der Erdkruste ausreichend vorhanden sind, wurde diskutiert, dass Silikate in wässriger neutraler Lösung als SiO_2 ausfallen und der Ribose-stabilisierende Effekt im Vergleich zu Boraten deshalb geringer ist. Andere Mineralien wie Calcium- und Molybdänkationen könnten ebenfalls in Frage kommen, wobei vor allem Molybdän auch bei neutralem pH und moderaten Temperaturen einen Pentose-stabilisierenden Effekt auch ohne Zugabe von Boraten zeigte.¹² In der Gruppe um *Davis* wurden Untersuchungen der Formose-Reaktion in Micellen mit hoher lokaler Formaldehydkonzentration durchgeführt. Hierbei wurde eine Pentose-Ausbeute von 65% abgeschätzt.¹³

Die *Kiliani-Fischer-Synthese* verlängert Kohlenhydrate über Blausäure-Addition und anschließender Reduktion des Nitrils mit Wasserstoff und Palladium auf Bariumsulfat.^{14,15} Basierend auf dieser Namensreaktion entwickelte die Gruppe um *Sutherland*¹⁶ eine präbiotische Synthesestrategie zu einfachen Zuckermolekülen über Photoredox-Chemie.

*Müller et al.*¹⁷ publizierten 1990 eine modifizierte Formose-Reaktion. Hier stellt Glykonaldehydphosphat das Edukt dar welches unter alkalischen Bedingungen mit Formaldehyd zu *rac*-Ribose-2,4-diphosphat mit bis zu 16% Ausbeute reagiert. In Abwesenheit von Formaldehyd (vergl. Abbildung 5) entsteht dagegen primär *rac*-Allose-2,4,6-triphosphat.

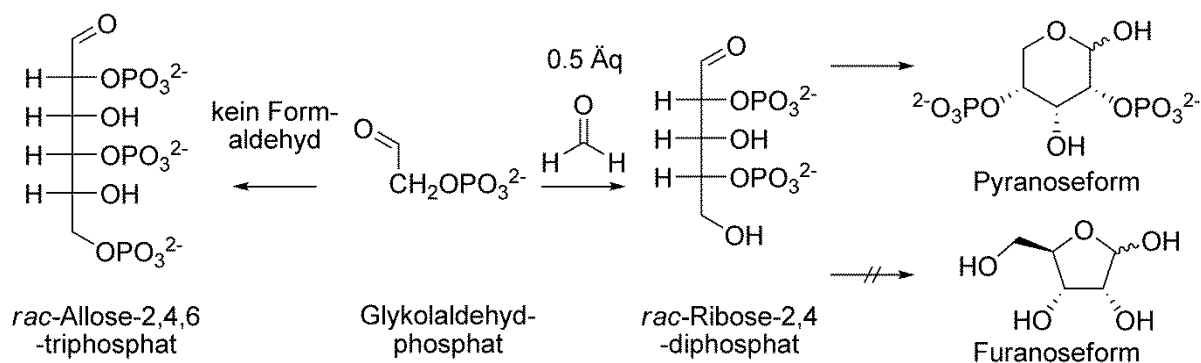


Abbildung 5: Modifizierte Formose-Reaktion ausgehend von Glykolaldehydphosphat. Mit Zugabe von Formaldehyd (0.5 Äq) entsteht *rac*-Ribose-2,4-diphosphat. Ohne Formaldehyd bildet sich das C6-Allose-Isomer als Hauptprodukt. Die Darstellung des *D*-Ribopyranose-2,4-diphosphats ist möglich. Ohne Phosphat-Umlagerung oder Abspaltung ist durch die 4'-Phosphat geschützten Hydroxygruppe eine Reaktion zu der Furanoseform nicht möglich. Die Struktur der *D*-Ribofuranose ist ohne Phosphatschutzgruppen abgebildet.¹⁷

Dieser Aldomerisierungsansatz setzt jedoch die Synthese von Glykolaldehydphosphat voraus. Dieses wird unter anderem durch Ozonolyse, ausgehend von Allylalkohol, dargestellt, was keine präbiotischen Bedingungen sind. Ferner entsteht nicht primär *D*-Ribose sondern das entsprechende Racemat.¹⁷ Desweiteren wäre die 4'-Hydroxygruppe der Ribose Phosphat-geschützt und die Bildung der Furanoseform somit gehindert. Ohne Phosphat-Umlagerung oder Abspaltung würde sich eine RNA in der Pyranoseform ausbilden.

3.1.2 Urey-Miller-Experiment

Löb veröffentlichte Anfang des 19ten Jahrhunderts die Bildung von Glycin bei stiller Entladung in einer Atmosphäre aus Ammoniak (NH₃), Wasserdampf (H₂O) und Methan (CH₄), brachte dies jedoch nicht in Verbindung mit der präbiotischen Entstehung.¹⁸ Miller stellte 1953 gezielt eine hypothetische Früherdatmosphäre dar. Diese simulierte er, wie in Abbildung 6 dargestellte, indem er Methan, Ammoniak, Wasser und Wasserstoff (H₂) elektrischer Ladung aussetzte. Dabei detektierte er die Entstehung von Alanin, Glycin, Asparaginsäure, α -Amino-*n*-butylsäure und zwei nicht identifizierter Substanzen.¹⁹ Unter verbesserten Bedingungen konnte Miller Glycin, *D,L*-Alanin, β -Alanin, Sarkosin, *D,L*- α -Amino-*n*-butylsäure und α -Aminoisobuttersäure und weitere bis dato nicht weiter identifizierte Substanzen präbiotisch erzeugen.²⁰ Nach Millers Tod wurden seine Proben erneut von Johnson *et al.* analysiert. Er konnte die Anwesenheit von weiteren 26 biologisch relevanten Substanzen nachweisen.²¹

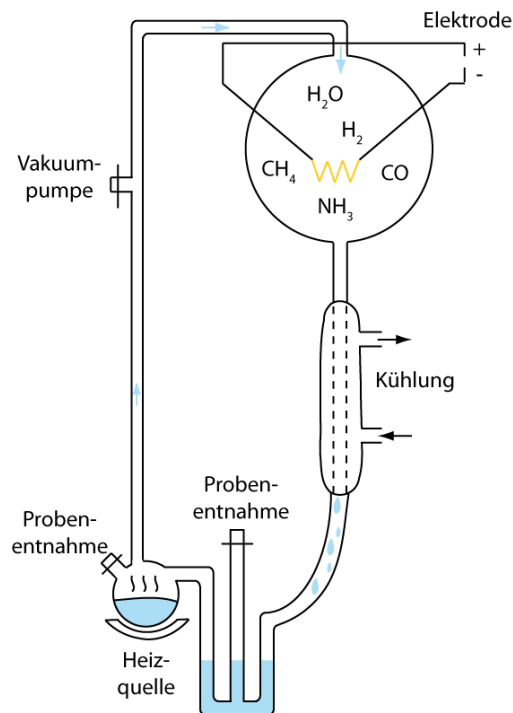


Abbildung 6: Apparatur des *Urey-Miller*-Experimentes. Die Apparatur steht unter einer Atmosphäre bestehend aus CH_4 , NH_3 , H_2O und H_2 . Kohlenmonoxid (CO) und H_2 kann aus der Reaktion von NH_3 und H_2O entstehen. Der Wasserdampf steigt in die Kugel mit der elektrischen Entladung. Diese Energie reicht aus, um essenzielle Moleküle zu synthetisieren, welche im Kondensator in das symbolisierte Meer in Form von Regen fallen. Hier bleiben sie in Lösung und reichern sich an. Visuell ist dieser Vorgang in Form von Eintrübung der zuvor klaren Lösung zu sehen.^{19,20}

3.2 Nukleobasen

Eine alternative Überlegung zu den *Urey-Miller*-Experimenten geht davon aus, dass biologisch relevante Moleküle möglicherweise über Meteoriten auf die Erde kamen. So wurden schon früh die D,L-Enantiomere der Aminosäuren Alanin, Valin und Prolin sowie Purine auf den *Murchison* Meteoriten gefunden.²²⁻²⁵ Des weiteren wurden kürzlich Purin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Xanthin, 2,6-Diaminopurin und 6,8-Diaminopurin auf mehreren kohlenstoffhaltigen Meteoriten entdeckt.²⁶ Wären Meteoriten demnach ein wichtiger Bestandteil der chemischen Evolution, so würden diese Entdeckungen einen Hinweis darauf geben, dass die ersten Formen eines genetischen Codes aus all diesen Purinen bestanden haben könnten. Dennoch besteht die Frage, wie die Nukleobasen entstanden sein könnten weiter. Die Überlegung, dass Nukleobasen über Meteoriten auf die Erde gekommen sein könnten verschiebt nur die Frage der Entstehung in andere Sphären.

3.2.1 Präbiotische Bildungswege von Pyrimidinen

Die präbiotische Bildung der Pyrimidine wurde erstmals von *Fox et al.* 1961 erforscht.²⁷ Ausgehend von Äpfelsäure und Harnstoff konnte in Anwesenheit von Polyphosphorsäure Uracil gewonnen werden. Bei der Verwendung von Oxalessigsäure und Ureidosuccinat statt Äpfelsäure konnte kein Uracil detektiert werden. Aufbauend auf Cyanoacetylen veröffentlichten *Ferris et al.* 1968 eine präbiotische Synthese im Alkalischen, welche in einer Ausbeute von 4.8% zu Cytosin führt.²⁸ Das benötigte Cyanoacetylen kann über elektrische Entladung in einer Stickstoff-Methan Atmosphäre präbiotisch erhalten werden.²⁹ Unter erhöhter Harnstoffkonzentration (15 m) konnten bei 100 °C sogar bis zu 53% Cytosin erhalten werden, welches wiederum zu Uracil hydrolysieren kann.³⁰ Werden lediglich 1 m Harnstoff eingesetzt sinkt die Ausbeute auf 3%, welche wiederum mit der Ausbeute von *Sanchez et al.* vergleichbar ist.³¹

Zwei vorgeschlagene Mechanismen, wie die Bildung der Pyrimidine unter diesen Bedingungen ablaufen könnte, sind in Abbildung 7 dargestellt. Im ersten Mechanismus wird zunächst Wasser an das Cyanoacetylen addiert (Abbildung 7, oben) wodurch Cyanoacetaldehyd entsteht. Mit Harnstoff kann dieses dann über das Ureid zum Cytosin zyklisieren. Die Hydrolyse von Cytosin zu Uracil erfolgt in gepuffertem Wasser bei pH-Werten zwischen 7 und 9. Der zweite Mechanismus (Abbildung 7, unten) geht ebenfalls vom Cyanoacetylen aus, welches in einer wässrigen Cyanid-Lösung auf 100 °C gebracht wird. Hier wird von einem zweimaligen Angriff eines Cyanats ausgegangen, um zum Ureid zu gelangen. Auf diese Weise kann Cytosin mit einer Ausbeute von bis zu 19% präbiotisch dargestellt werden.²⁸

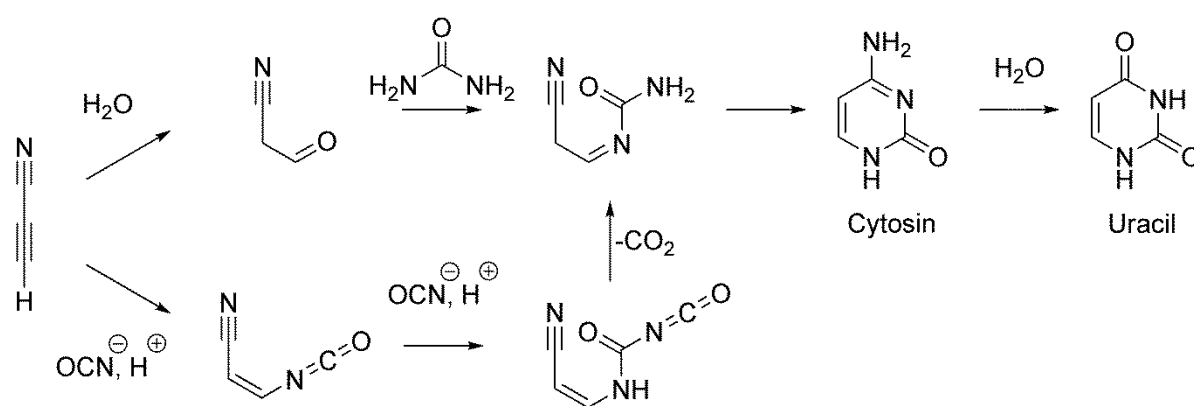


Abbildung 7: Vorgeschlagene Mechanismen zu den Pyrimidin-Nukleobasen Cytosin und Uracil.²⁸

Cleaves et al. untersuchten die Bildung der Pyrimidine bei niedrigen Temperaturen.³² Bei 0 °C ergab ein Gemisch aus Cyanoacetaldehyd und Guanidin im Überschuss nach einer Reaktionsdauer von zwei Monaten knapp 11% Uracil und in geringen Mengen ebenfalls Cytosin.

3.2.2 Präbiotische Bildungswege von Purinen

Oró zeigte 1960 erstmals, dass auch Purin-Nukleobasen präbiotisch dargestellt werden können. Eine wässrige Ammoniumcyanid-Lösung wurde bei 90 °C für 24 h zur Reaktion gebracht, worauf die Bildung von Adenin nachgewiesen werden konnte.³³ Ein möglicher Mechanismus wurde in einer späteren Arbeit 1961 vertieft in der ein potentieller Bildungsweg vorgestellt wurde.³⁴ Zunächst könnte in der alkalischen Lösung aus zwei Hydrogencyaniden das Iminoacetonitril entstehen (Abbildung 8–a). Ein Cyanidion reagiert mit dem Iminoacetonitril was das Trimer Aminomalonodinitril (Abbildung 8–b) ergibt. In dem Ammoniaküberschuss reagiert ein weiteres Hydrogencyanid zu Formamidin (Abbildung 8–c) und das Trimer aus Reaktion 2 zu Aminomalonodiamidin (Abbildung 8–d). Formamidin und Aminomalonodiamidin könnten nun zu 4-Aminoimidazol-5-carboxamidin (AICAI) kondensieren (Abbildung 8–e). Dieses kann final mit Formamidin zu Adenin kondensieren (Abbildung 8–f). Zusammenfassen entsteht somit aus fünf Hydrogencyaniden ein Adenin.³⁵

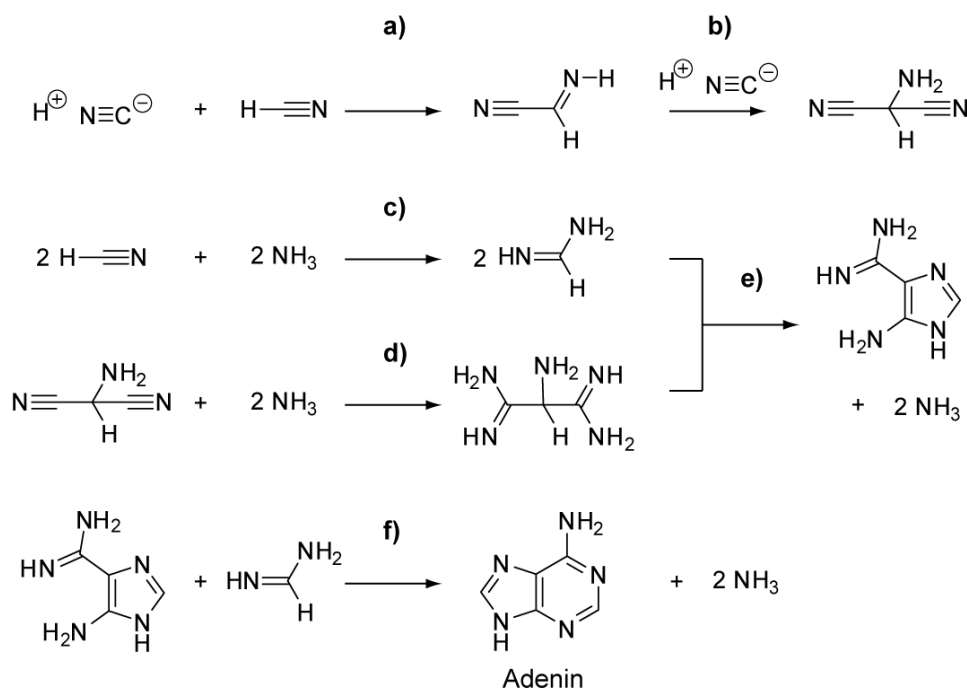


Abbildung 8: Präbiotische Darstellung von Adenin nach Oró.³⁴ Fünf HCN ergeben ein Adenin.

Eine präbiotische Synthese von Purinen ausgehend von Formamid wurde von *Bredereck et al.*³⁶ realisiert und wird bis heute stetig erweitert. So hat die Gruppe um *Orlando*³⁷ Adenin und Guanin ausgehend von Formamid dargestellt. In Kombination mit UV-Einstrahlung wurde ebenfalls die Bildung von Guanin detektiert. Auf diesem Weg wurde die Entstehung von dem Dimer Diaminomaleonitril (DAMN) postuliert. Das Hauptprodukt war meistens Purin, welches auch ohne Zusatz von Salzen wie CaCO_3 und $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ entstand. *Hudson et al.*³⁸ untersuchten den Mechanismus im Detail und kamen zu dem Ergebnis, dass der

Mechanismus nahe an dem der Purinbiosynthese liegt und dabei ein Glycinderivat ein wichtiges Intermediat darstellt.

3.2.3 Präbiotische Bildungswege von Purinen und Pyrimidinen

Nach weiteren Untersuchungen der Formamid-basierten Bildung von Purinen konnte festgestellt werden, dass unter Zusatz verschiedener Mineralien nicht nur Purine sondern auch die Pyrimidine Cytosin und Uracil entstanden.³⁹ Bei Zugabe von Boraten können neben den Nukleobasen auch Aminosäuren und biogene Carbonsäuren detektiert werden. Hier ist Purin allerdings das Hauptprodukt und ohne Borat-Zugabe das einzige Produkt.⁴⁰

Basierend auf der Annahme, dass der präbiotische Ursprung der Moleküle des Lebens möglicherweise in einer „Eiswelt“ lag, in der Zersetzungsreaktionen verlangsamt wären, wurde von *Menor-Salvan et al.* ein Weg vorgestellt, auf dem ebenfalls Purine und Pyrimidine präbiotisch gebildet werden konnten.^{41,42} Unter UV-Einstrahlung und Temperaturen zwischen -21 °C und 5 °C konnten Guanin, Adenin, Cytosin sowie Uracil aus Acetylen, Harnstoff und Wasser gewonnen werden.⁴³ Neben den natürlichen Nukleobasen werden besonders Hydantoin und daneben Harnsäure und Xanthin detektiert.

3.3 Nukleoside

3.3.1 Präbiotische Bildungswege von Pyrimidin-Nukleosiden

Während die präbiotische Bildung von Nukleobasen auf verschiedenen Wegen gut nachvollziehbar ist, erweisen sich wissenschaftliche Bestrebungen zur Aufklärung der präbiotischen Nukleosid-Bildung als problematischer. Insbesondere steht die Bildung der glykosidischen Bindung zwischen Nukleobasen und Zuckermolekülen unter wässrigen Bedingungen stets mit nukleophilerem Wasser in Konkurrenz. Unter Gleichgewichtsaspekten ist ferner die Spaltung der glykosidischen Bindung im wässrigen Milieu begünstigt. *Sanchez et al.* publizierten die erste Synthese von Pyrimidin-Nukleosiden. Sie setzten D-Ribose-5-phosphat mit Cyanamid um und erhielten eine Addition an die 1'OH- und 2'OH-Gruppen. Das entstandene Aminooxazolin-Derivat reagierte in einer Folgereaktion mit Cyanoacetylen und nach anschließender Hydrolyse zum α -Cytidin. Bei der Behandlung der wässrigen Lösung mit einer ungefilterten Lichtquelle (253 nm) konnte eine Photoanomerisierung zum natürlichen β -Cytidin beobachtet werden. Erwartungsgemäß ergab unter diesen Reaktionsbedingungen die Umsetzung mit D-Arabinose das β -konfigurierte Arabinosylpyrimidin.⁴⁴

Die Gruppe um *Sutherland*⁴⁵ eröffnete einen weiteren Weg zu Pyrimidin-Nukleosiden. Ausgehend von Cyanamid, Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Cyanoacetylen und Ammoniumdihydrogenphosphat wurde über drei Stufen das β -Ribocytidin-2',3'-cyclophosphat **i** mit ca. 5% Ausbeute gewonnen (Abbildung 9). Zunächst wird in einem gepufferten System Glykolaldehyd mit Cyanamid kondensiert, um schließlich nach Zugabe von Glycerinaldehyd 15% Aminooxazol **ii** zu erhalten. Dieses kann mit Cyanoacetylen zum Anhydroarabinonucleosid **iii** reagieren. Die darauf folgende Phosphorylierung führt zum Pyrimidin-Ribonukleotid **i**. Die Bestrahlung von Pyrimidin-Ribonukleotid **i** mit 254 nm führt mit bis zu 42% zur Hydrolyse zum Uridin-Ribonukleotid **iv**. Neben der Depyrimidierung zu Cytosin (5%) und Uracil (4%) wird ebenfalls Edukt **i** (43%) reisoliert. Auf diese Weise kann eine direkte Glykosylierung umgangen werden. Jedoch steht auch hier die Frage der Plausibilität im Raum, da die Reaktionslösungen stets gepuffert werden müssen und die Verbindungen gereinigt in die einzelnen Reaktionen eingehen müssen.

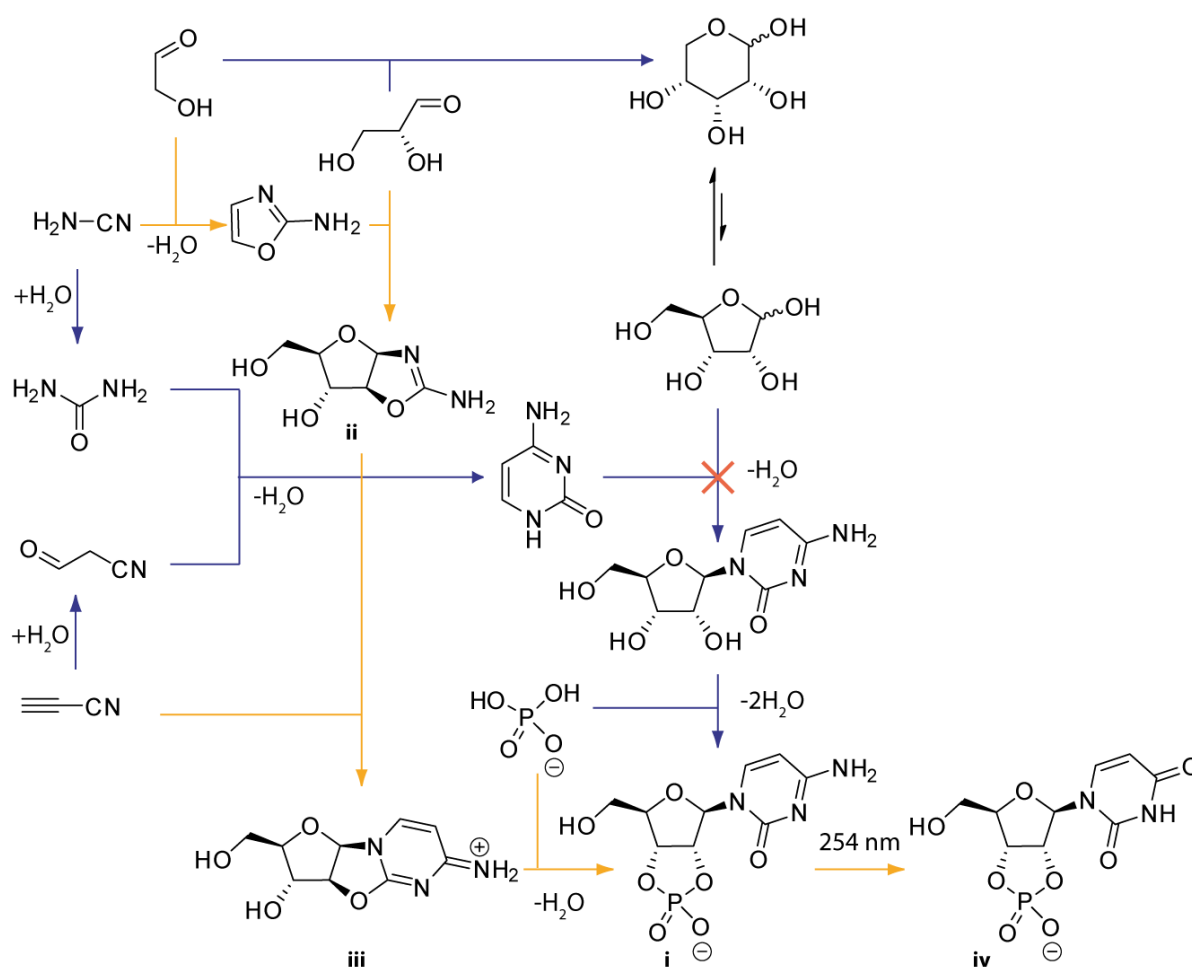


Abbildung 9: Präbiotische Synthese der Pyrimidin-Ribonukleotide **i** und **iv**. Hier wird die bis jetzt noch nicht im wässrigen mögliche direkte Glykosylierung umgangen, indem das Ribonukleotid vom Zucker her aufgebaut wird. Blau – schon bekannter Weg, der an der Glykosylierung scheitert. Orange – neuer Weg, welcher das Ribonukleotid liefert.⁴⁵

3.3.2 Präbiotische Bildungswege von Purin-Nukleosiden

Die direkte Kondensierung von Purin-Nukleobasen und Ribose konnte von *Fuller et al.* gezeigt werden, allerdings unter wasserfreien Bedingungen.⁴⁶ Im Fall von Adenin entstand bei einem pH-Wert von 4.5 hierbei primär das N6-verknüpfte Produkt (Abbildung 10) mit bis zu 74% Ausbeute. Die Ausbeute von Adenosin wurde auf 0.03% geschätzt. Das ebenfalls entstehende, an N6 und N9 zweifach glykosylierte Derivat konnte in einer weiteren Reaktion zu Adenosin umgewandelt werden, was die Ausbeute des α/β -Gemisches auf geschätzte 0.21% verbesserte. In Anwesenheit von Natriumtrimetaphosphat, inklusive Hydrolyse, konnte die Ausbeute auf ungefähr 4% Adenosin gesteigert werden. Weitere Experimente mit Zusätzen von Meerwassermineralien konnten die Ausbeute bezüglich Adenosin nicht weiter erhöhen.⁴⁷ Auffällig war jedoch, dass die Synthesen von Inosin und Guanosin mit Ausbeuten von bis zu 20% (bezogen auf zurückgewonnenes Startmaterial) effizienter abliefen. Ein Umsatz unter wässrigen Bedingungen konnte nicht detektiert werden.

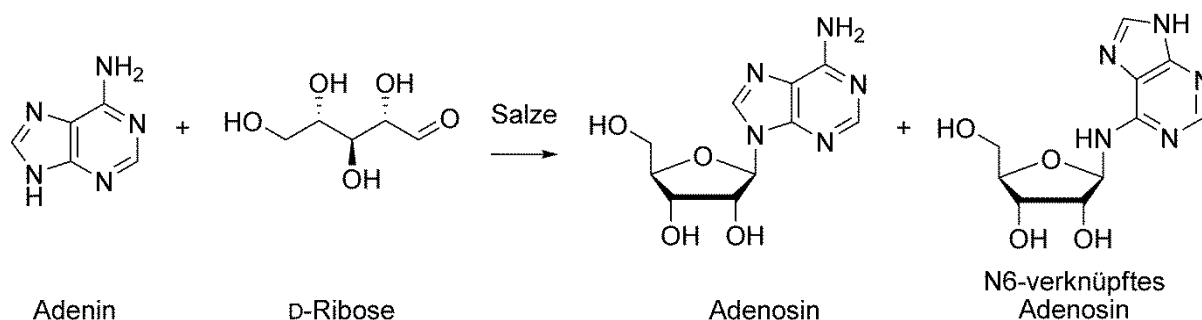


Abbildung 10: Präbiotische Glykosylierung nach *Orgel*.⁴⁶ Hier werden Adenin und Ribose mit verschiedenen Salzen unter Festphasenbedingung zur Reaktion gebracht. Das Hauptprodukt bildet hierbei das N6-verknüpfte Adenosin.

Versuche den präbiotischen Syntheseweg zu den Pyrimidin-Nukleosiden⁴⁵ von *Powner et al.* auf die Purin-Nukleoside zu übertragen konnte bislang noch nicht bewerkstelligt werden.⁴⁸

3.4 RNA Assemblierung

3.4.1 RNA-Welt-Hypothese

Durch die Entdeckung der selbst-spleißenden RNA^{49,50} und der katalytischen Wirkung von RNA⁵¹ im Allgemeinen entstand eine neue Theorie im Zusammenhang mit der Präbiotik. Es entwickelte sich die RNA-Welt-Theorie.⁵² *Gilbert* postuliert, dass Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid* – RNA) nicht nur als Templat für die Evolution wichtig war, sondern, dass auch die katalytischen Aktivitäten von Bedeutung sind. Die RNA-Welt-Hypothese geht davon aus, dass RNA vor der DNA anwesend war und rudimentär die Aufgaben von DNA und Enzymen übernehmen konnte. Später könnte sie dann z.B. durch reverse Transkription

durch die stabilere doppelsträngige DNA als Informationsspeicher und durch die effizienteren Enzyme für die katalytischen Reaktionen ersetzt worden sein.⁵²

3.4.2 Alternativen zur Furanose-RNA

Die uns bekannte RNA in der Furanoseform kann synthetisch geändert werden. Durch RNA-Festphasensynthese mit den Pyranosederivaten kann die lineare einzelsträngige Pyranosyl-RNA (p-RNA) synthetisiert werden. Diese kann ebenfalls als Duplex vorliegen und geht eine stärkere Adenin-Uracil Paarung als in der RNA ein.⁵³ Die p-RNA ist ebenfalls in der Lage Replikationen durchzuführen, was darauf hindeuten könnte, dass die RNA-Welt ebenfalls aus p-RNA bestehen könnte.⁵⁴ Die Gruppe um *Eschenmoser* untersuchte intensiv die Eigenschaften verschiedener p-RNAs und kam zu dem Schluss, dass die Natur wohl mehr Flexibilität benötigt, als es die p-RNA geben kann. So wäre für die Selbstassemblierung eine starke Basenpaarung zwar von Vorteil, die Autokatalyse der Selbstreplikation würde jedoch dadurch erschwert. Anscheinend benötigt die Natur ein System, welches weniger stark bindet. Eine weitere ungeklärte Frage wäre die Umwandlung der p-RNA in die RNA. Da hier noch kein realistischer Mechanismus entdeckt wurde, geht man bislang noch davon aus, dass sich die Natur über einen direkten Weg für die Furanoseform entschieden hat.⁵⁵

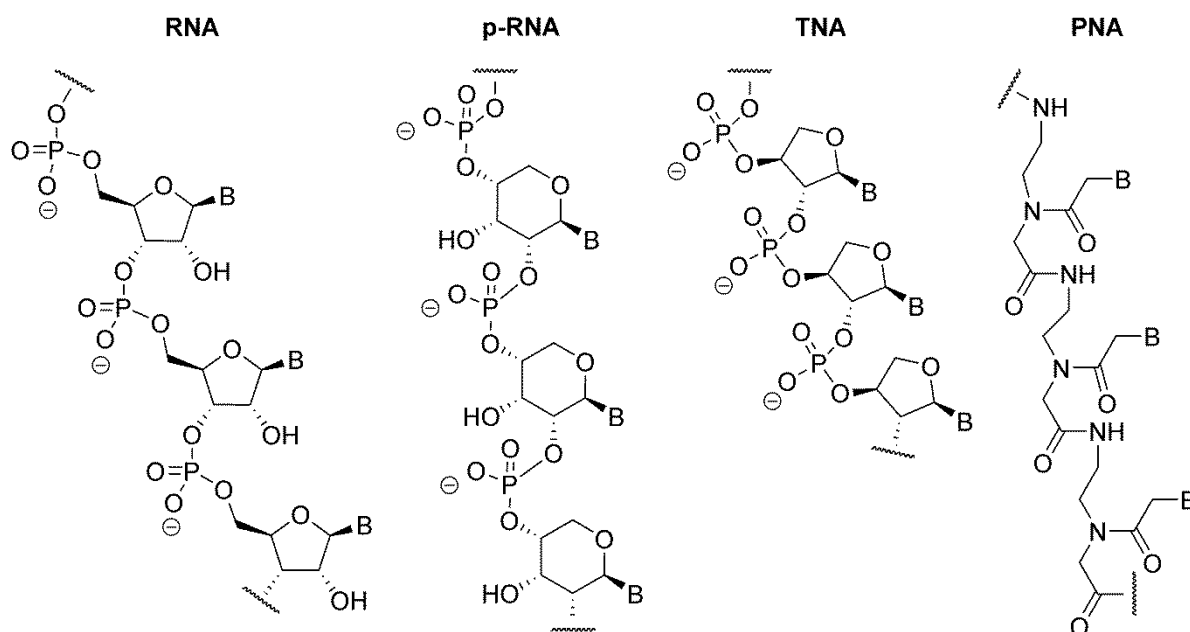


Abbildung 11: RNA und seine Analoga. RNA – Nukleinsäure der Ribofuranose, p-RNA – Nukleinsäure-Analoga der Ribopyranose, TNA – Nukleinsäure-Analoga der Threose, PNA – Nukleinsäure-Analoga mit Aminosäure-Rückgrat, B – Nukleobasen.

Weitere Alternativen stellen die in Abbildung 11 dargestellten Threose-Nukleinsäuren (engl. *threose nucleic acid* – TNA) und die Peptid-Nukleinsäure (engl. *peptide nucleic acid* – PNA) dar. TNA kann nicht nur mit sich selbst eigenständig *Watson-Crick* Basenpaarung eingehen, sondern auch mit den natürlichen Nukleinsäuren und ist wie DNA relativ resistent gegenüber

der Hydrolyse des Stranges.⁵⁶⁻⁵⁸ Kürzlich wurde herausgefunden, dass TNA die Fähigkeit besitzt sich in eine Tertiärstruktur zu falten, um eine komplexe Funktion erfüllen zu können, was darauf hindeuten könnte, dass sie als Vorstufe für die RNA gedient haben könnte.⁵⁹ Der Austausch des DNA-Rückgrats durch Polyamide wurde erstmals von *Nielsen* vorgestellt.⁶⁰ Es wurde festgestellt, dass PNA extrem stabile DNA-PNA Hybride bilden kann, was auf die fehlende elektrostatische Abstoßung der beiden Stränge sowie die eingeschränkte Flexibilität des Polyamid-Rückgrates zurückgeführt wurde. *Nelson et al.* zeigten im Jahr 2000 einen präbiotischen Weg zu den Komponenten, welche für den Bau einer PNA nötig wären. Doch steht noch die essenzielle Verknüpfung der Monomere auf präbiotischem Weg aus.⁶¹

3.4.3 Oligomerisierung

Die Selbstassemblierung der RNA-Bausteine stellt die Wissenschaft noch immer vor ein Rätsel. Für die Bildung von Peptiden konnte hingegen von *Leman et al.* unter präbiotischen Bedingungen eine Synthese von Tetrameren realisiert werden.⁶²

Kürzlich wurde eine katalysierende Wirkung des Schichtsilikats Montmorillonit in Anwesenheit von Natriumsalzen (z.B. NaCl) bei der präbiotischen Synthese von RNA-Oligomeren aus aktiviertem Adenosinmonophosphat diskutiert. In Abwesenheit von Natriumsalzen konnte Montmorillonit lediglich die Synthese von Dimeren und Spuren von Trimeren bewirken. Unter Zugabe von Natriumsalzen konnte Oligomere mit bis zu zwölf Repetiereinheiten detektiert werden.⁶³

Ein zusätzliches Problem der RNA-Oligomerisierung unter präbiotischen Bedingungen stellt die Selektivität dar. So werden nicht nur die 3',5'- sondern auch die 2',5'-Verknüpfungen (Abbildung 12a) aufgefunden.^{64,65}

*Engelhart et al.*⁶⁶ untersuchten das Verhalten der gut untersuchten Flavinmononukleotid Aptamere und der *Hammerhead*-Ribozyme unter zufälligem 10-50%igen Einbau von 2',5'-Verknüpfungen. Der 50%ige Einbau ergab eine 200fach niedrigere Aktivität, wohingegen sich die Aptamerbindung bei 10%igem Einbau lediglich 10fach reduzierte und die Aktivität des *Hammerhead*-Ribozymes um 20% reduziert wurde. Somit wäre eine gewisse Toleranz der 2',5'- gegenüber der 3',5'-Verknüpfung gegeben. Davon abgesehen senken 2',5'-Verunreinigungen in der RNA den Schmelzpunkt. Somit könnte ein RNA Duplex bei moderateren Temperaturen zum Einzelstrang geöffnet und folglich die Replikation vereinfacht werden.

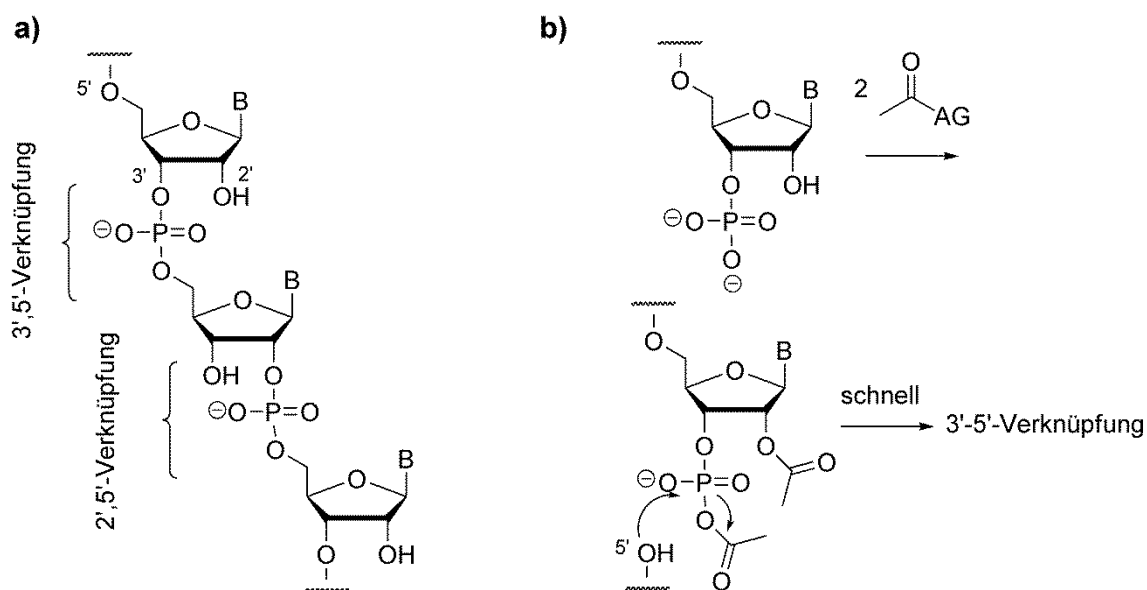


Abbildung 12: **a)** Die möglichen Verknüpfungen der RNA. Dargestellt sind die korrekte 3',5'- und die fehlerhafte 2',5'-Verknüpfung. **b)** 2-fache Acetylschätzung, Aktivierung und Ligation unter präbiotischen Bedingungen. AG – Abgangsgruppe. B – Nukleobase.⁶⁵

*Bowler et al.*⁶⁷ entschieden sich für eine Herangehensweise, in der sie versuchten, ein aktiviertes Monomer zu finden, welches primär zu 3',5'-Verknüpfungen führt. Sie untersuchten das Verhalten von Adenosin-3'-phosphat und Adenosin-2'-phosphat in Gegenwart der Aktivatoren Cyanoacetylen und Thioacetat. Die 2'- bzw. 3'-Acetylschätzung der Alkohole⁶⁸ erfolgte, vor allem im Gemisch, primär bei der Reaktion mit Adenosin-3'-phosphat. Die anschließende Deacetylierung führte zu einer weiteren Anreicherung der korrekten 3',5'-Verknüpfungen, da die 2',5'-Verknüpfungen zur Hydrolyse neigen.

Kürzlich wurde von *Chen et al.*⁶⁹ über eine spontane präbiotische Bildung von β -Ribofuranosid-Derivaten berichtet, welche mit einem komplementären Heterozyklus assemblieren. Ausgehend von Ribose und 2,4,6-Triaminopyrimidin konnte im wässrigen Milieu eine C-C-Verknüpfung zwischen dem Pyrimidin und der Ribose beobachtet werden. Wenn der Mischung Cyanursäure zugesetzt wird bilden sich nicht kovalent gebundene Supramoleküle im Mikrometer-Maßstab.

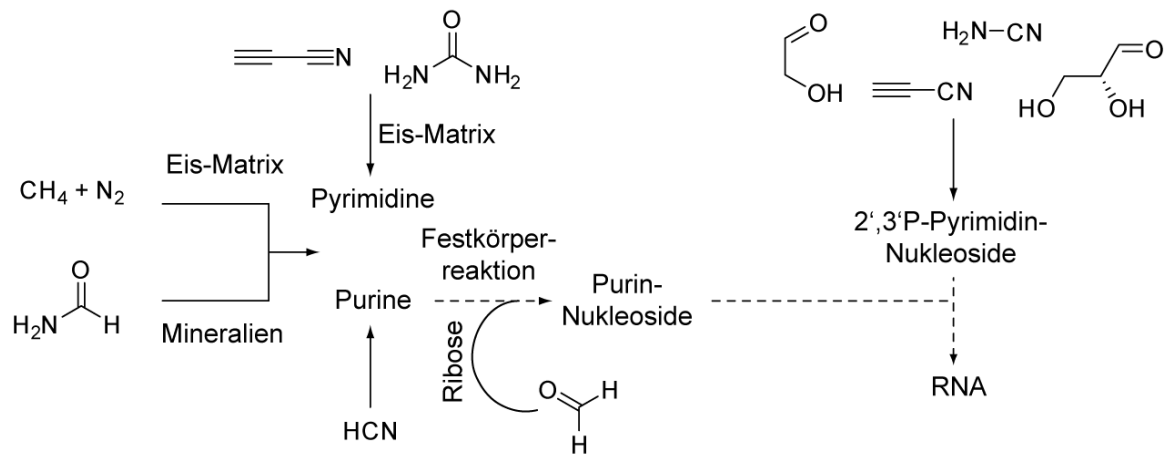


Abbildung 13: Mögliche Wege um präbiotisch RNA zu synthetisieren. Der Weg zu den Nukleobasen wurde aus verschiedensten Perspektiven untersucht. Um zu einer Ligation der Nukleobasen zu kommen bedarf es noch weitere Untersuchungen bezüglich der präbiotischen Synthese von Purin-Nukleosiden.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, wurden präbiotische Wege zu den Nukleobasen bereits gut erforscht. Darüber hinaus wurde ein plausibler Weg zu den Pyrimidin-Nukleosiden gefunden. Im Hinblick auf mögliche RNA-Bildungen fehlen noch immer präbiotisch plausible Reaktionen zu den Purin-Nukleosiden.

4 Präbiotische Synthese von Purin-Nukleosiden

4.1 Aufgabenstellung

Die Frage, wie die Moleküle des Lebens entstanden sein könnten und wie sie sich zu den essentiellen Makromolekülen assembliert haben könnten, kann vielleicht nie vollständig beantwortet werden. Doch mit Hilfe neuer Techniken und alternativen Herangehensweisen werden stetig neue Ideen geboren, welche dazu beitragen können, zusätzliche plausible Puzzleteile zu liefern.

Zahlreiche Studien zu dem Thema präbiotischer Chemie führten schon zu interessanten Einblicken in die potentielle „Ursuppe“. Besonders die präbiotische Chemie zur Entstehung der Purinbasen konnte bereits mit plausibel einfacher Chemie nachgestellt werden. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Urwelt wasserhaltig war, wird nun nach den Entstehungsmöglichkeiten geforscht, wie die urzeitliche Glykosylierung zu den jeweiligen Nukleosiden im wässrigen Milieu abgelaufen sein könnte.

Ziel dieser Arbeit war es unter wässrigen Bedingungen einen präbiotischen Zugang zu den Purin-Nukleosiden zu eröffnen, sowie die Bereitstellung einer analytischen Methode, um die präbiotischen Versuche untersuchen zu können.

4.2 Methodik der präbiotischen Messungen

Purinbasen besitzen mindestens vier Stickstoffatome, die eine Reaktion eingehen können. Im Fall von Adenin **1** gibt es sogar fünf Stickstoffatome, welche potentiell mit dem Aldehyd der Ribose reagieren können. So wurde bei der Festphasenreaktion von Adenin **1** und Ribose in der *Orgel*-Gruppe 6-*N*-Adenosin als Hauptprodukt erhalten.⁴⁶ Ferner können sich das α - und das β -Anomer bilden. Bei der Reaktion von Adenin **1** mit Ribose können sich folglich zehn mögliche Produkte in der Furanoseform ergeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein präbiotischer Ansatz ausgearbeitet, welcher auf der intermediären Entstehung von Formamidopyrimidinen beruht. Ausgehend von den bereits gut untersuchten Wegen zu den Nukleobasen (siehe Kapitel 3.2) wurde die bereits bekannte Imidazolringöffnung angenommen.⁷⁰ Formamidopyrimidine wie beispielsweise 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FaPyA **2**, Abbildung 16) besitzen im Vergleich zu den Purin-Nukleobasen eine höhere Löslichkeit in Wasser und so kann das exozyklische Amin mit der Ribose zur Schiff'schen Base kondensieren (vgl. Abbildung 14). Als Triebkraft wird der darauf folgende intramolekulare Ringschluss vermutet, welcher unter Wasserabspaltung eine Rearomatisierung mit sich führt und zum gewünschten Nukleosid reagieren kann. Um die entstandene Suspension zu analysieren wurden Koinjektions-Experimente mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) durchgeführt. Hierfür wurden Referenzmoleküle benötigt, welche ebenso wie die Formamidopyrimidine für die präbiotische Reaktion synthetisch hergestellt wurden.

Die Messungen der präbiotischen Glykosylierungsprofile wurden an einer hochauflösenden Orbitrap durchgeführt. Aus dem aufgenommenen Spektrum wurde der jeweils gesuchte Massenbereich um die theoretische Masse in Abhängigkeit der gewählten Auflösung ($R = 30000$) extrahiert. Die Messungen wurden im positiven Modus durchgeführt, weshalb die Moleküle in der ionisierten Form $[M+H]^+$ zu beobachten waren, wobei M für das jeweilige monoisotopische Molekül steht.

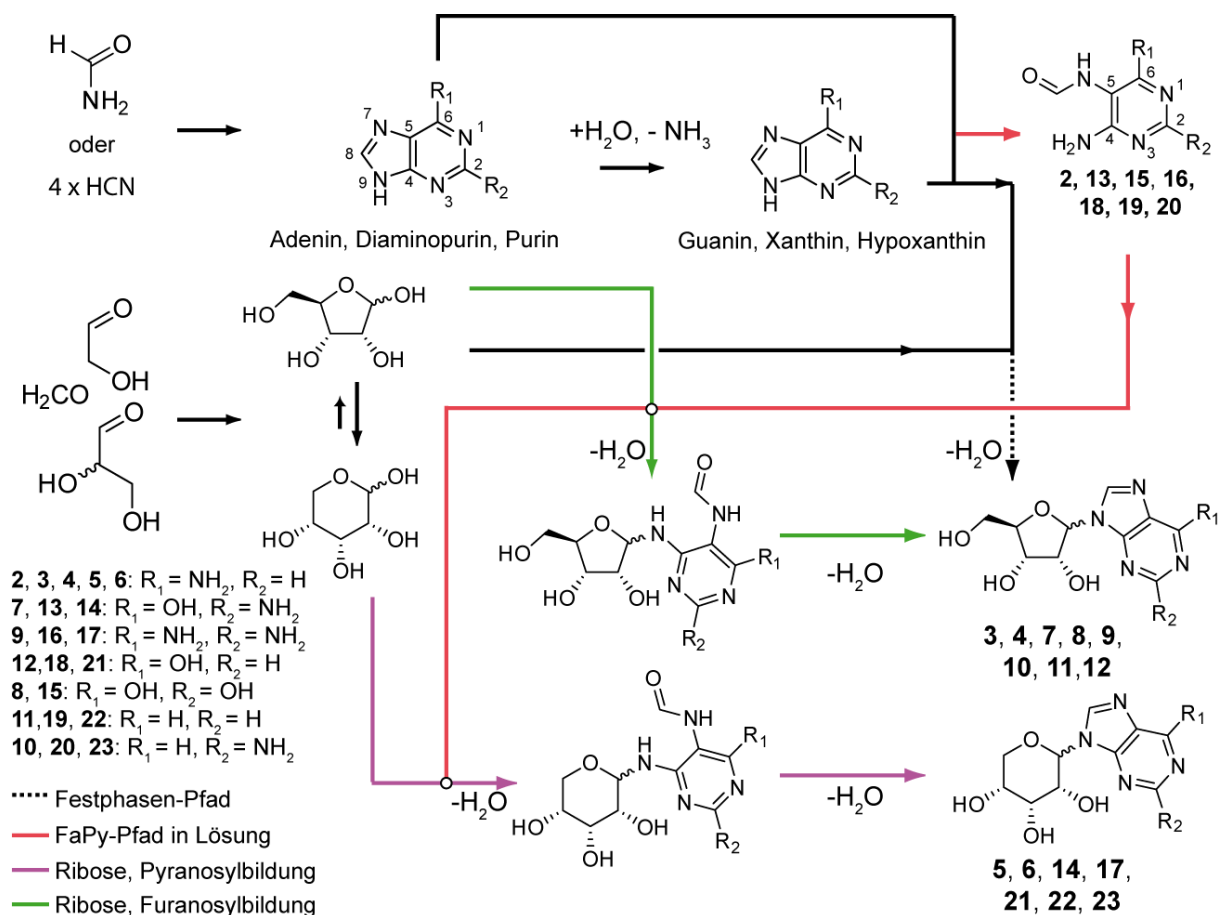


Abbildung 14: Der präbiotische Weg zu den Purin-Nukleosiden führt über die bereits bekannten Synthesen zu den Purinen ausgehend von Formamid oder HCN. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Weg zu den Purin-Nukleosiden per Festphasensynthese. Die rote Linie steht für den Weg in wässriger Lösung über die Formamidopyrimidine. In grün wird die Reaktion zu den Furanosyl-Derivaten und in lila die Reaktion zu den Pyranosyl-Derivaten.

Um Optimalbedingungen zu finden, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht. Neben Zeitintervallen zwischen 46 und 336 h, Reaktionstemperaturen von 25 bis 120 °C und der Auswirkung der Zugabe verschiedener Salze wurde die Art der Komponentenzugabe getestet. Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurde die präbiotische Reaktion nach entsprechender Reaktionszeit abgebrochen, indem sie auf Raumtemperatur abgekühlt und etwa 1:1000 verdünnt wurde. Nach Filtration konnte die Lösung direkt per HPLC-MS analysiert werden.

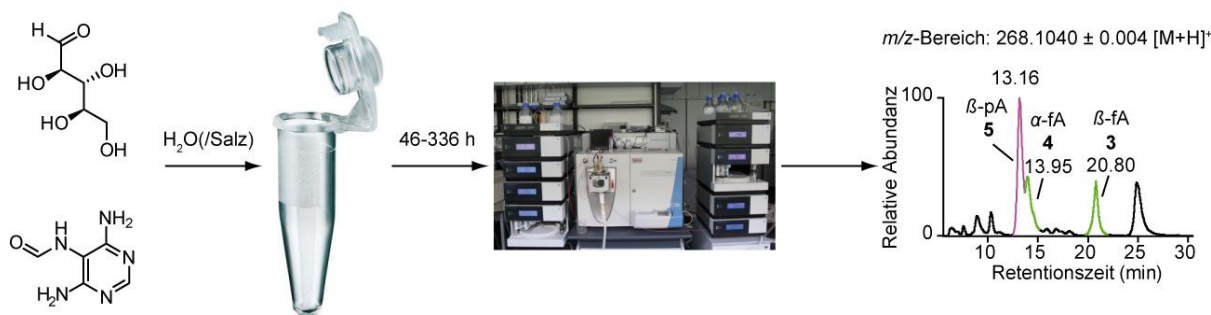


Abbildung 15: Schematischer Arbeitsablauf. Ribose, FaPyA **2** (und Salze) wurden in Wasser suspendiert und 2-14 Tage bei 85 °C zur Reaktion gebracht. Eine 1:1000 Verdünnung wurde *via* hochauflösender HPLC-MS (LTQ-Orbitrap) analysiert und die Signale wurden mittels Koinjektion von synthetischen Standards zugeordnet. Lila – Bildung der Pyranoseform; Grün – Bildung der Furanoseform. Dargestellt ist das MS-Chromatogramm des extrahierten Massenbereiches von Adenosin **3** in der protonierten Form von $[M+H]^+$ mit $m/z=268.1040 \pm 0.004$.

Die Referenznukleoside wurden separat analysiert und später mit dem präbiotischen Ansatz koinjiziert, um die Entstehung der jeweiligen Nukleoside zu bestätigen. Bei Erhöhung der entsprechenden MS-Signale und Übereinstimmung der Retentionszeiten kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Nukleoside entstanden sind.

4.3 Präbiotische Ansätze mit FaPyA (2)

4.3.1 Darstellung von Adenosin

Zunächst wurde die präbiotische Nukleosidbildung an dem C2-symmetrischen FaPyA **2** durchgeführt. Durch die Symmetrie ist es egal ob Ribose mit der Aminogruppe von C4 oder C6 die Schiff'sche Base eingeht. Somit sollten lediglich die α - und β -Anomere der Pyranose- und der Furanoseform entstehen.

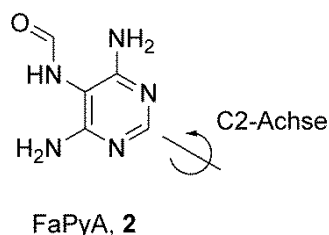


Abbildung 16: Strukturformel des C2-symmetrischen 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidins FaPyA **2**.

FaPyA **2** (0.13 M) wurde mit Ribose (0.13 M) in Ab- und Anwesenheit verschiedener Salze (NaH_2PO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{MgCl}_2$, Na_2HPO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, CaCO_3 , Na_2CO_3 und $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$) in Wasser bei verschiedenen Temperaturen versetzt. In initialen Experimenten konnte eine Produktbildung erst ab einer Temperatur von 85 °C detektiert werden. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass die Reaktionen bei 85 °C stattfinden. Die ersten HPLC-MS Untersuchungen ergaben in der Tat die Bildung von primär vier

Produkten. Mittels Koinjektion konnte die Bildung des natürlichen RNA-Nukleosids Adenosin **3** festgestellt werden. Ebenso wurde die Bildung von α -Adenosin **4** und β -Ribopyranosyladenosin **5** nachgewiesen. Die Variation der Salze ergab eine deutliche Auswirkung auf die Produktbildung. Der Gebrauch verschiedener Salze hat eindeutige Effekte auf die Reinheit der Reaktion. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass eine Reaktion von FaPyA **2** mit Ribose ohne Salzzugabe mit erstaunlicher Reinheit verläuft. Der Zusatz von $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ führt hingegen zu einer dramatischen Zunahme an Nebenprodukten. Der Versuch, über eine verdünntere Lösung eine geringere Anzahl an Nebenprodukten zu erhalten führte zu keiner Produktbildung. Somit spielt auch die hohe Konzentration der Lösung eine entscheidende Rolle.

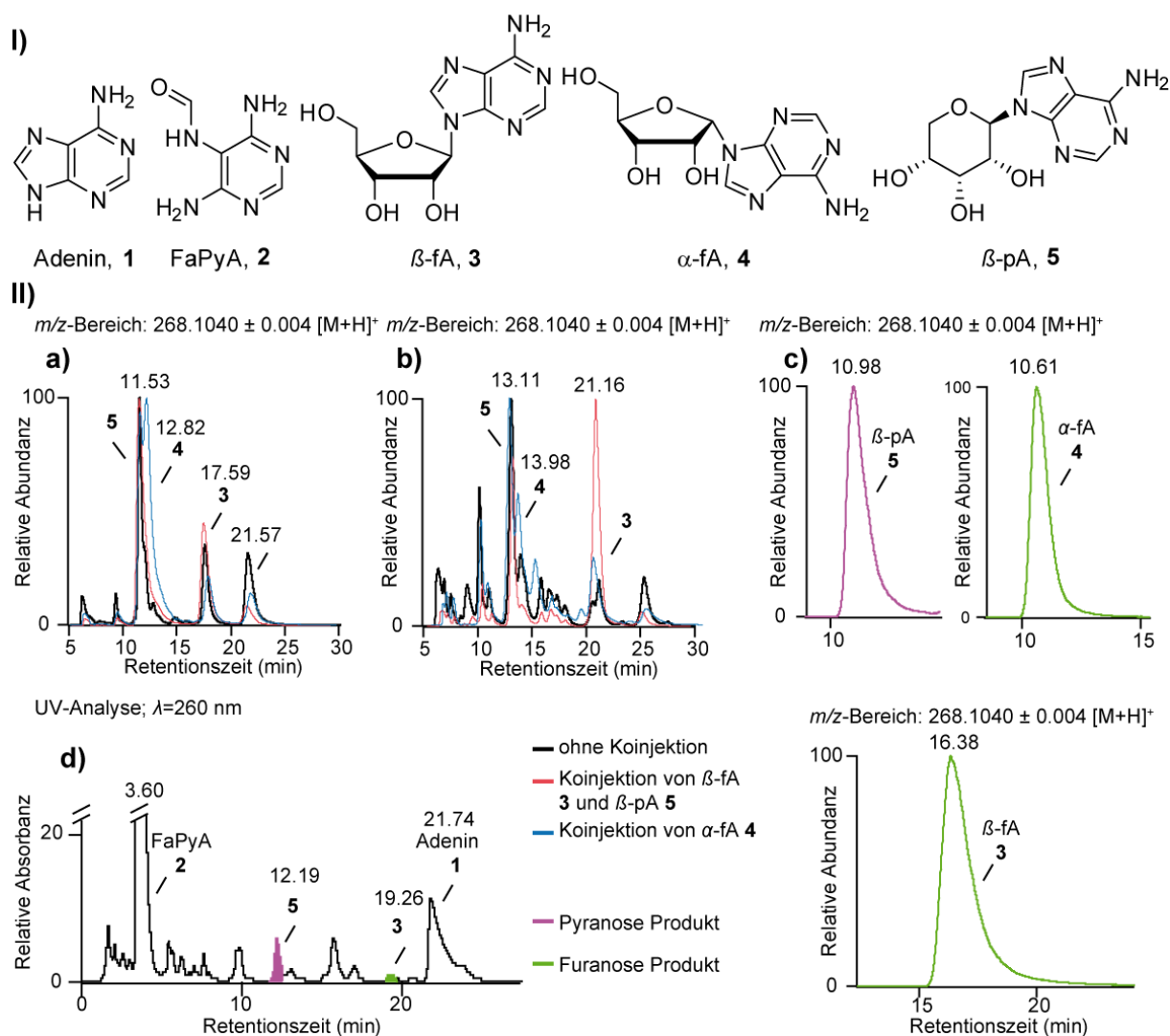


Abbildung 17: **I)** Relevante Moleküle der Koinjektionsexperimente: Adenin **1**, FaPyA **2**, α -fA **4** [α -Furanosyladenosin (f: furanosyl)], β -pA **5** [β -Pyranosyladenosin (p: pyranosyl)] und β -fA **3** [Adenosin]; **II)** Beispiele der LC-MS-Chromatogramme. **a)** MS-Chromatogramm des extrahierten Massenbereichs von Adenosin in der protonierten Form ($m/z=268.1040 \pm 0.004 [M+H]^+$) nach der Reaktion von FaPyA **2** mit Ribose ohne Salz; **b)** MS-Chromatogramm des extrahierten Massenbereichs von Adenosin in der protonierten Form ($m/z=268.1040 \pm 0.004 [M+H]^+$) nach der Reaktion mit $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$; **c)** MS-Chromatogramm des extrahierten Massenbereichs von Adenosin in der protonierten Form ($m/z=268.1040 \pm 0.004 [M+H]^+$) nach den synthetisch dargestellten Nukleosiden α -fA **4**, β -pA **5** und β -fA **3**; **d)** UV-Chromatogramm nach der Reaktion mit NaH_2PO_4 ($\lambda=260 \text{ nm}$).

Die Ausbeute wurde anhand des UV-Spektrums ermittelt. Mit Hilfe der in Abbildung 18 dargestellten Eichgeraden von Adenosin **3**, β -pA **5**, Adenin **1** und FaPyA **2** konnte das aufgenommene UV-Chromatogramm integriert werden und eine Ausbeute von 0.3% für β -fA **3** sowie 1.8% β -pA **5** bei der Zugabe von NaH_2PO_4 ermittelt werden. Mit den restlichen, nicht identifizierten Derivaten, würde sich eine Adenosinanalogausbildung von ungefähr 4% ergeben. Ebenso waren noch 45.5% FaPyA **2** und 4.5% Adenin **1** vorhanden. Um die Reaktion von Adenin mit Ribose unter wässrigen Bedingungen auszuschließen wurde eine Kontrollreaktion mit Adenin **1** durchgeführt. Im Gegensatz zur Festphasenreaktion der *Orgel*-Gruppe konnte unter wässrigen Bedingungen auch nach 5 Monaten keine Bildung eines Adenosinderivates festgestellt werden. Die Glykosylierung kann nach dem Ringschluss von FaPyA **2** zu Adenin **1** nicht mehr ablaufen. Adenin müsste über eine Ringöffnungsreaktion mit TiO_2 oder Riboflavin wieder zurückreagieren.⁷⁰⁻⁷² Folglich entstanden Adenosinanaloga bei der NaH_2PO_4 -katalysierten Reaktion von FaPyA **2** mit Ribose mit einer Gesamtausbeute von 8% bezogen auf zurückgewonnenes Startmaterial.

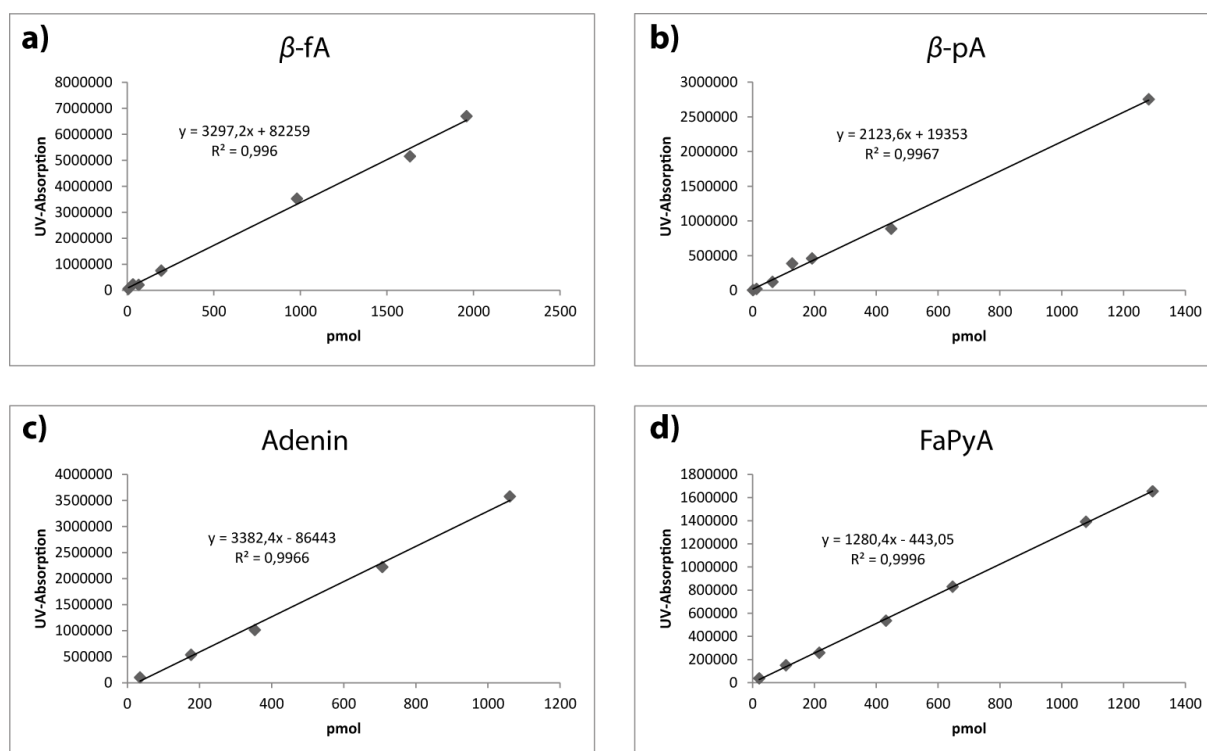


Abbildung 18: Eichgeraden von a) Adenosin **3**, b) β -pA **5**, c) Adenin **1** und d) FaPyA **2**.

Bei stetiger Zugabe von Ribose über drei Tage konnte die Ausbeute auf 0.6% β -fA **3**, 2.8% β -pA **5**, 23% FaPyA **2** und 0.9% Adenin **1** gesteigert werden, was jedoch zu keiner deutlichen Verbesserung der Gesamtausbeute führte. Wurde dagegen $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ statt Phosphat als Salz verwendet, wurden 1.0% β -fA **3**, 3.1% β -pA **5**, 77.7% FaPyA **2** und 3.6% Adenin **1** erhalten. Der FaPyA-Zerfall ist unter diesen Bedingungen geringer und so konnte über kontinuierliche Zugabe von Ribose die Ausbeute gesteigert werden, wie in Tabelle 1 dargestellt ist.

Tabelle 1: Ausbeutenbestimmung. **1)** Je 1 Äq Ribose und NaH_2PO_4 bei 85 °C, **2)** 9 x 1 Äq Ribose und ohne Salz bei 85 °C, **3)** Je 9 x 1 Äq Ribose und NaH_2PO_4 bei 85 °C, **4)** Je 9 x 1 Äq Ribose und $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ bei 85 °C, **5)** Je 9 x 1 Äq Ribose und CaCO_3 bei 85 °C, **6)** Je 22 x 1 Äq Ribose und $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ bei 85 °C, **7)** Je 22 x 1 Äq Ribose und $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ bei 120 °C, **8)** Je 16 x 1 Äq Ribose und $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ /Borax bei 85 °C. *brsm* – Ausbeute basierend auf zurückgewonnenes Startmaterial (engl. *based on recovered starting materials*).

Nr.	3 in % [<i>brsm</i>]	5 in % [<i>brsm</i>]	Adenin 1 in %	FaPyA, 2 in %
1	0.3 [0.7]	1.8 [3.5]	4.5	45.5
2	0.6 [1.7]	2.9 [7.5]	1.8	60.0
3	0.6 [0.8]	2.8 [3.7]	0.9	22.7
4	1.0 [5.6]	3.1 [16.3]	3.6	77.7
5	0.8 [1.8]	3.3 [7.3]	2.1	53.3
6	0.7 [0.7]	3.4 [3.6]	1.9	-
7	0.4 [1.7]	2.6 [11.3]	10.2	66.5
8	2.4 [2.5]	2.4 [2.5]	5.2	-

Da nach einer Reaktionszeit von drei Tagen und einer kontinuierlichen Zugabe von Ribose noch immer FaPyA mit 77.7% detektiert werden konnte, wurde die Reaktion auf sieben Tage verlängert. Hier konnte jedoch keine weitere Ausbeutenverbesserung festgestellt werden. Vielmehr scheint sich ein Gleichgewicht zwischen den Adenosinderivaten und Formamidopyrimidin einzustellen. Im Fall einer Temperaturerhöhung auf 120 °C ist eine deutliche Zunahme der Adeninbildung zu erkennen. Um ein vermeintliches Gleichgewicht auszunutzen, könnten Fällungsexperimente durchgeführt werden. Somit könnte das bereits entstandene Adenosin aus der Lösung gebracht werden, um Neues zu bilden.

Die Ribopyranoseform ist im Vergleich zu der Furanoseform die thermodynamisch bevorzugte Konstitution, was sich in den bisherigen präbiotischen Experimenten widerspiegelte (siehe Tabelle 1). Um die Bildung der Furanosederivate zu begünstigen, wurde dem Reaktionsgemisch Borax zugesetzt. Da Borax cis-ständige Alkohole stabilisiert,¹⁰ sollte die Geometrie der Ribose derart verändert werden, dass der Ringschluss zur Pyranoseform weniger günstig ist. Die Zugabe von Borax steigerte die Ausbeute von Adenosin auf 2.4% und Adenosin: β -pA wurden in einem Verhältnis von 1:1 erhalten (Tabelle 1, Eintrag 8). Jedoch führte die Verwendung von Borax zur Zersetzung von FaPyA. Neben FaPyA wurden auch andere Produkte mit der gleichen Retentionszeit detektiert.

Neben den gewünschten Nukleosiden wurden zu unterschiedlichen Retentionszeiten andere Moleküle mit der gleichen monoisotopischen Masse gefunden. Mögliche Nebenprodukte mit der gleichen Masse könnten das α -pA **6** oder 6-*N*-Adenosinderivate sein. Diesen Produkten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

Um eine höhere Regioselektivität zu erhalten, wurde die präbiotische Reaktion ausgehend mit Ribose-5-phosphat durchgeführt. Die Schützung der 5' OH-Gruppe sollte die Reaktion zur

Furanose einschränken. Die ersten Experimente ergaben jedoch, dass unter den gewählten Bedingungen (85 °C) die Phosphat-Gruppe hydrolysierte und folglich neben den zwei möglichen Phosphat-Adenosinanomeren ebenfalls Adenosin **3** und β -pA **5** entstanden. Davon abgesehen ist ein präbiotisch plausibler Weg zu Ribose-5-phosphat nicht bekannt.⁷³

4.3.2 Darstellung von Adenosin unter Formose-ähnlichen Bedingungen

Motiviert durch diese Erkenntnisse wurde die präbiotische Glykosylierungsreaktion an eine vorhergehende Formose-Reaktion gekoppelt (vgl. Kapitel 3.1.1). Eine Mischung aus Formaldehyd, Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd wurde mit Borax und Calciumhydroxid versetzt. Nach sechs Stunden bei 25 °C wurden FaPyA **2** sowie diverse Salze zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 85 °C erhitzt. In der Tat konnte die Bildung des gewünschten D/L-Adenosins detektiert werden. Die Ausbeuten waren unterhalb des UV-Detektionslimits, weshalb von einer Ausbeute kleiner als 0.1% ausgegangen werden kann. Dennoch zeigt die Bildung der gewünschten Derivate, dass trotz der allgemein mäßigen Ausbeuten der Formose-Reaktionen unter allen gewählten Bedingungen eine Bildung (Tabelle 2) von Adenosin **3** möglich ist.

Bei dem Einsatz von Bariumhydroxid⁷⁴ (Tabelle 2, Nr. 12) konnte keine merkliche Verbesserung oder Verschlechterung festgestellt werden, weshalb die folgenden Experimente weiter mit Calciumhydroxid durchgeführt wurden.

Tabelle 2: Präbiotische Reaktionen mit FaPyA **2** unter formoseähnlichen Bedingungen. C1 – Formaldehyd, C2 – Glykolaldehyd Dimer, C3 – Glycerinaldehyd, Borax – $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$. ✓ – Bildung von entweder D/L- β -FA **3** oder D/L- β -pA **5**.

Nr.	FaPyA [Äq]	Salz [Äq]	C1 [Äq]	C2 [Äq]	C3 [Äq]	Borax [Äq]	X(OH) ₂ [Äq]	t[h]/ T[°C]	β -f	β -p
9	1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	-	1	1	1	Ca [1]	168/ 85	✓	✓
10	1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	1	1	1	1	Ca [1]	504/ 85	✓	✓
11	1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	1	1	-	1	Ca [1]	168/ 85	✓	✓
12	1	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	1	1	1	1	Ba [1]	105/ 85	✓	✓
13	1	$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ [1]	1	1	1	1	Ca [1]	268/ 85	✓	✓

4.3.3 Präbiotische Darstellung der Tetrosederivate von Adenosin

Threosen und die abgeleiteten Threose-Nukleinsäuren (vgl. Kapitel 1.4.2, TNA) wurden ebenfalls als RNA-Vorläufer diskutiert und untersucht.⁵⁶ Die Untersuchungen der formoseähnlichen Reaktionen ergaben, dass ebenso die Bildung der Tetrosederivate detektiert werden konnte. Die Ergebnisse, dass hier Signale bei der berechneten Masse gefunden werden, könnte somit die Möglichkeit der Relevanz von Threosen unterstützen. Die Entstehung von Hexosen, beziehungsweise Nukleosid-Analoga der C6-Zucker, konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Tabelle 3: Präbiotischer Ansatz mit den Tetrosen L-(+)-Threose und D-(-)-Erythrose.

Nr.	FaPyA [Äq]	(NH ₄)HCO ₃ [Äq]	C4 [Äq]	t[h]/T[°C]
14	1	1	L-(+)-Threose [1]	74/85
15	1	1	D-(-)-Erythrose [1]	74/85

Für eine genauere Untersuchung der Glykosylierungsreaktion wurden D-(-)-Erythrose und L-(-)-Threose jeweils mit FaPyA **2** und (NH₄)HCO₃ umgesetzt. Diese Ansätze wurden über HPLC-MS mit dem Massenfilter von $m/z=238.0935 \pm 0.004$ für $[M+H]^+$ -Molekülionensignale der Tetrosen-Derivate untersucht und mit der Massenspur der Formose-Reaktion verglichen. Eine Koinjektion der beiden Ansätze zeigt Überschneidungen im Produktspektrum beider Reaktionen. In Abbildung 19 und Abbildung 20 sind die entsprechenden Koinjektionsexperimente dargestellt. Die blauen Linien stellen die Formose-Reaktion, die olivgrünen Linien die Reaktion mit D-(-)-Erythrose respektive mit L-(-)-Threose und die schwarzen Linien die Koinjektion dar. Im Fall der Reaktion mit D-(-)-Erythrose ist deutlich zu sehen, dass bei 15.27 min das Signal zunimmt (Abbildung 19).

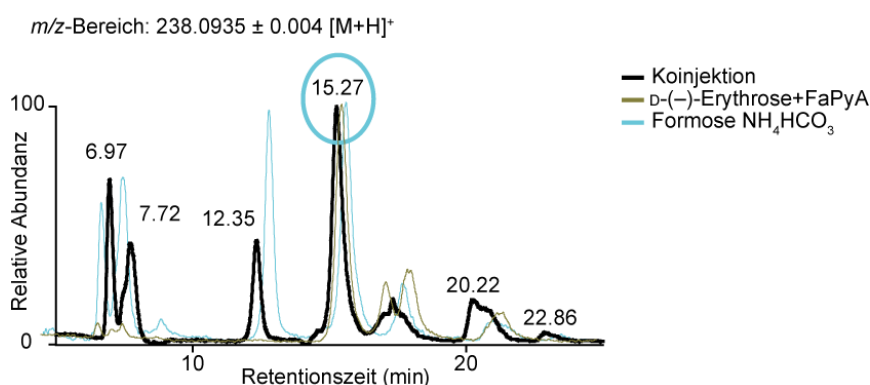


Abbildung 19: Die schematische Darstellung des Koinjektionsexperiments für D-(-)-Erythrose. Blau – die Analyse der Formose-Reaktion (Formaldehyd, Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Borax, Ca(OH)₂, FaPyA, (NH₄)HCO₃). Olivgrün – die Analyse der präbiotischen Reaktion mit D-(-)-Erythrose und (NH₄)HCO₃. Schwarz – Koinjektion der beiden Reaktionen. Dargestellt ist das MS-Chromatogramm des extrahierten Massenbereichs von D-(-)-Erythrose in der protonierten Form ($m/z=238.0935 \pm 0.004 [M+H]^+$).

Für die Reaktion von FaPyA **2** mit L-(–)-Threose wurden zwei Überschneidungen detektiert. Hier kann eine Signalzunahme bei 16.82 min und 20.58 min beobachtet werden (Abbildung 20).

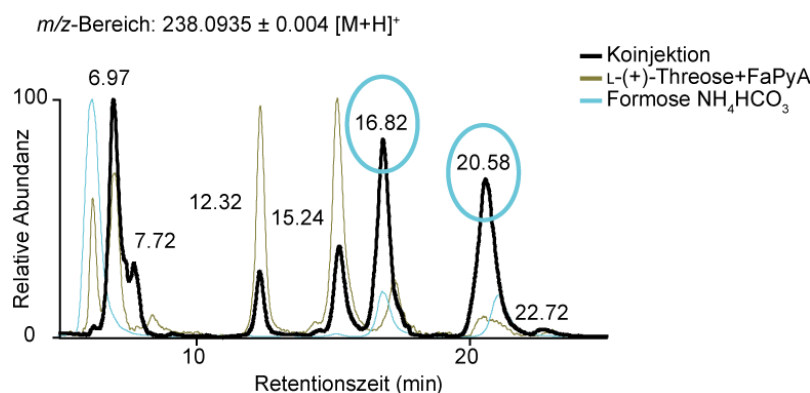


Abbildung 20: Die schematische Darstellung des Koinjektionsexperiments für L-(–)-Threose. Blau – die Analyse der Formose-Reaktion (Formaldehyd, Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Borax, Ca(OH)₂, FaPyA, (NH₄)HCO₃). Olivgrün – die Analyse der präbiotischen Reaktion mit L-(–)-Threose und (NH₄)HCO₃. Schwarz – Koinjektion der beiden Reaktionen. Dargestellt ist das MS-Chromatogramm des extrahierten Massenbereichs von L-(–)-Threose in der protonierten Form ($m/z=238.0935 \pm 0.004 [M+H]^+$).

Somit wurden unter den hier gewählten Formose-Bedingungen nicht nur Adenosin **3** und seine Derivate erhalten, neben den Adenin-Tetrosenukleosiden wurde ein großer Molekülreichtum beobachtet.

4.4 Präbiotische Ansätze mit FaPyG und Analoga

Da die Glykosylierungen unter präbiotischen Bedingungen mit FaPyA erfolgreich waren, wurden die präbiotischen Reaktionsbedingungen an anderen Formamidopyrimidinen getestet.

Da auch Analoga von Purin-Nukleosiden in der Lage sind die meisten Funktionen der kanonischen Nukleoside Adenosin **3** und Guanosin **7** (neben den zahlreichen Modifikationen – siehe Kapitel 5.1) zu erfüllen,⁷⁵ könnte eine prä-RNA aus einer Vielzahl an Nukleosiden bestanden haben.⁷⁶ Daher wurden ebenfalls die Nukleosid-Analoga Xanthosin (β -fX, **8**), 2,6-Diaminonebularin (β -fDN, **9**), 2-Aminonebularin (β -f2N, **10**) und Nebularin (β -fN, **11**) sowie das Hydrolyseprodukt von Adenosin **3**, Inosin (β -fHX, **12**) untersucht. Inosin kommt als natürliche Modifikation in der mRNA und der tRNA vor und ist Teil der RNA-Editierung.⁷⁷

4.4.1 Darstellung von Guanosin und Nebularinanaloga

Es ist ein deutlicher Unterschied der Reaktionen von FaPyG **13** in verschiedenen Ansätzen zu erkennen. In Abbildung 21 ist der salzhaltige Ansatz mit CaCO_3 dargestellt. Die Zugabe der Salze $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, CaCO_3 oder $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ergaben die besten Resultate. Jedoch lag unter diesen Bedingungen die Produktmenge unterhalb des UV-Detektions Limits, weshalb keine Ausbeutekalkulation möglich war ($\text{Ausbeute} \leq 0.1\%$). Die geringere Reaktivität von FaPyG **13** im Vergleich zu FaPyA kann über elektronenziehende Effekte der Carbonylfunktion erklärt werden, welche die Nukleophilie der exozyklischen Aminogruppe abschwächt.

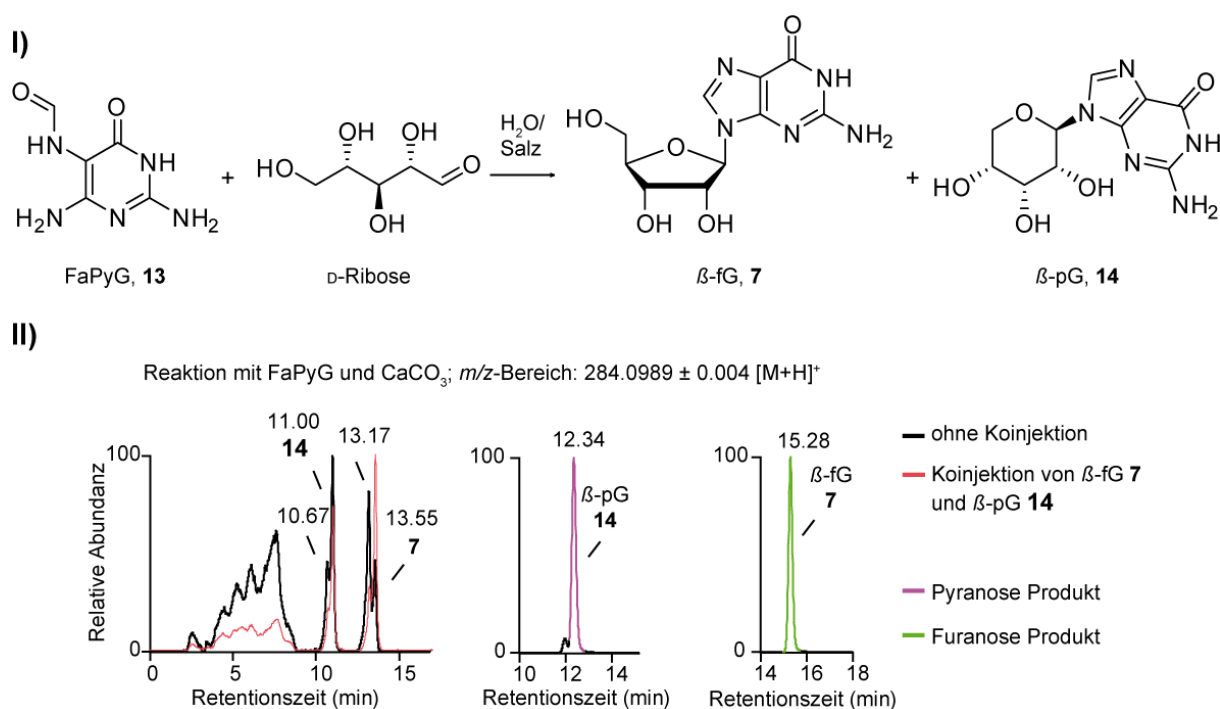


Abbildung 21: I) Reaktionsschema von FaPyG **13** mit D-Ribose zu β -fG **7** und β -pG **14**. II) LC-MS-Chromatogramm der extrahierten Masse von Guanosin in der protonierten Form ($m/z=284.0989 \pm 0.004 [M+H]^+$) der Reaktion von FaPyG mit CaCO_3 . In rot ist das Koinjektions-Experiment abgebildet.

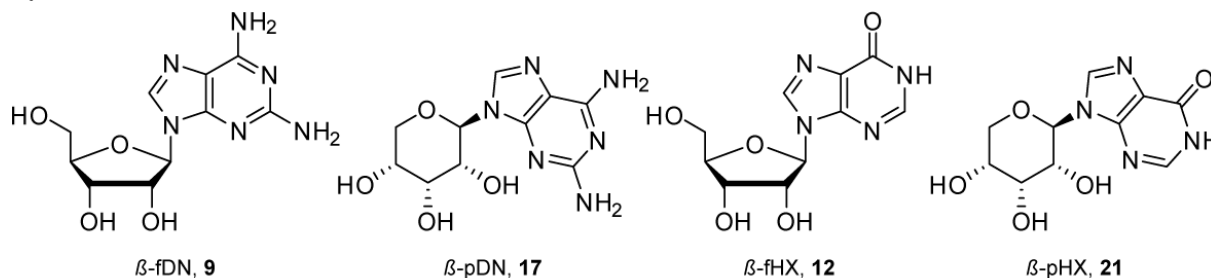
In Abbildung 21 ist gezeigt, dass sich im Fall einer Nukleosidbildung mit CaCO_3 -Zugabe das β -pG **14** ($R_t=11.00$ min) im Vergleich zu β -fG **7** ($R_t=13.55$ min) in besseren Ausbeuten bildet. So entsteht zum Beispiel bei dem Zusatz von $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$ lediglich die Pyranoseform β -pG **14**.

Bei den Versuchen, Xanthosin **8** zu bilden, spiegelte sich der oben beschriebene Effekt der geringeren Reaktivität, bedingt durch die elektronenziehende Carbonylfunktion, dramatisch wieder. Hier konnte unter keinen der getesteten Bedingungen eine Xanthosin-Bildung festgestellt werden. Die zusätzliche Carbonylfunktion in FaPyX **15** führt zu einem extrem unreaktiven Startmaterial.

Die Bildung von 2,6-Diaminonebularinderivaten aus FaPyDN **16** konnte unter allen getesteten Bedingungen mit Ausnahme von Na_2CO_3 durchgeführt werden. Das beste

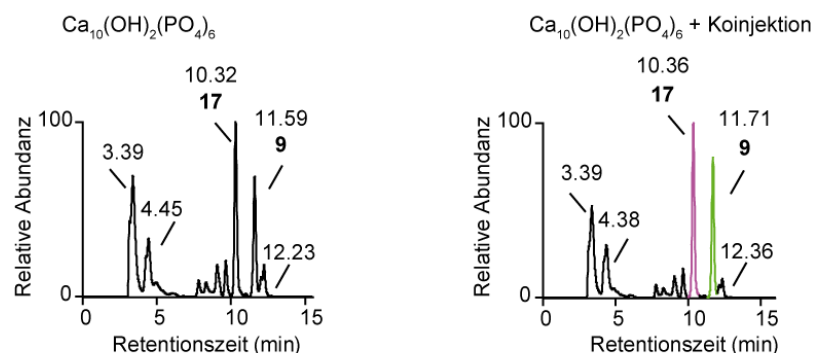
Ergebnis lieferte die Zugabe von $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$. Hier konnte β -fDN **9** fast in einem 1:1 Verhältnis zu β -pDN **17** detektiert werden. Das Startmaterial FaPyDN **16** weist wie FaPyA **2** ebenfalls eine C2-Symmetrie auf, womit sich die Anzahl der Glykosylierungsprodukte halbiert. Wie bei der Reaktion mit FaPyG **13** stellt eine Konkurrenzreaktion jedoch die exozyklischen Aminogruppen an Position C2 und C6 dar.

I)



II)

a) Reaktion mit FaPyDN und $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$; m/z -Bereich: $268.1149 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$



b) Reaktion mit FaPyHX und CaCO_3 ; m/z -Bereich: $269.0880 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$

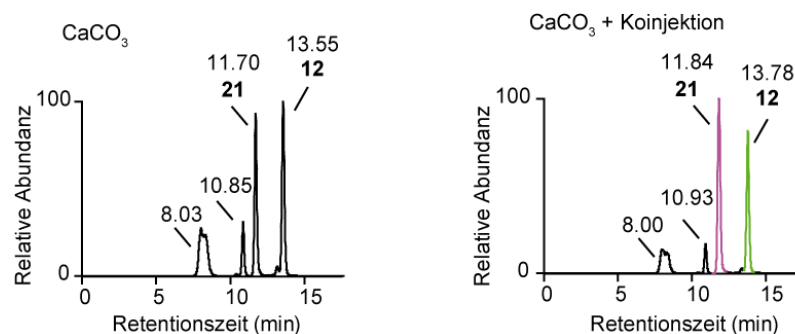


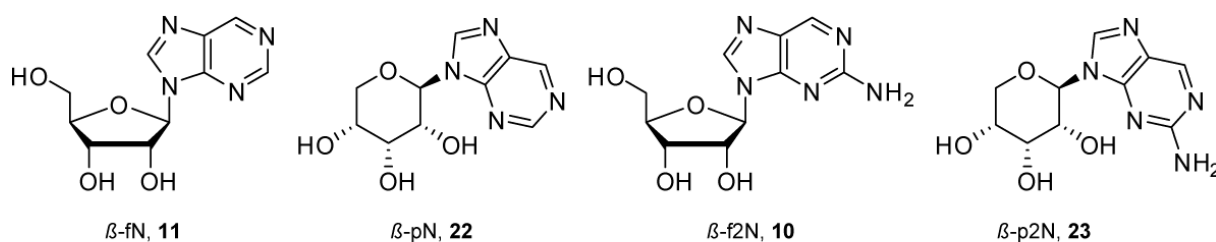
Abbildung 22: **I)** Produkte präbiotischer Glykosylierungen β -fDN **9**, β -pDN **17**, β -fHX **12** und β -pHX **21**. **II)** LC-MS-Chromatogramm der extrahierten Massen in der protonierten Form von den präbiotischen Reaktionen mit **a)** FaPyDN ($m/z=268.1149 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$) und **b)** FaPyHX ($m/z=269.0880 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$) sowie die entsprechenden Koinjektions-Experimente mit den synthetischen Standards.

Die präbiotischen Reaktionen mit FaPyHX **18**, FaPyN **19** und FaPy2N **20** wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Amrei Deutsch durchgeführt.⁷⁸ Für die Reaktion zu Inosin **12** konnte trotz des elektronenziehenden Effekts der Carbonylfunktion eine gute Produktbildung festgestellt werden. FaPyHX **18** reagierte zwar nicht unter allen getesteten Bedingungen,

jedoch wurde eine deutlich geringere Anzahl von Nebenprodukten – unter Verwendung von $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ mit nur drei Inosinderivaten (Abbildung 22) – erhalten. Ohne Zusatz eines Salzes konnte nur die Bildung von β -pHX **21** detektiert werden (vgl. Tabelle 4).

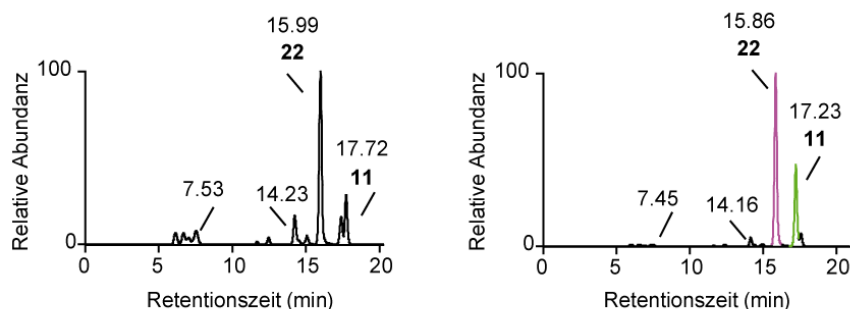
Die präbiotischen Synthesen zu den Nebularinnukleosidderivaten konnten unter allen getesteten Bedingungen durchgeführt werden. Da FaPyN **19** das einfachste Startmaterial darstellt, scheint die Beobachtung plausibel. Auch hier dominierte die Bildung von β -pN **22** (Abbildung 23).⁷⁸

I)



II)

a) Reaktion mit FaPyN und $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$; m/z -Bereich: $253.0931 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$
 $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ + Koinjektion



b) Reaktion mit FaPy2N und $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$; m/z -Bereich: $268.1040 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$
 $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ + Koinjektion

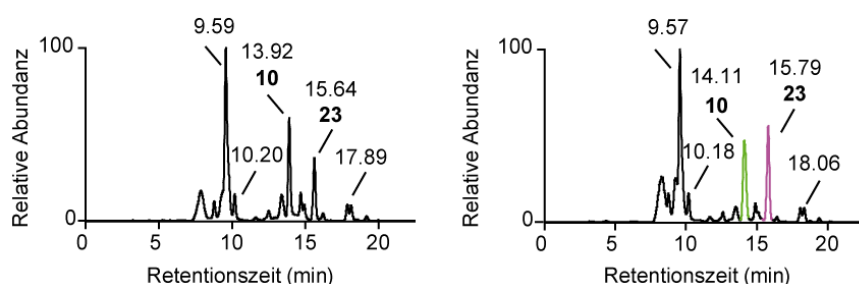


Abbildung 23: I) Produkte präbiotischer Glykosylierungen β -fN **11**, β -pN **22**, β -f2N **10** und β -p2N **23**. II) LC-MS-Chromatogramm der extrahierten Massen der protonierten Form von den präbiotischen Reaktionen mit **a)** FaPyN ($m/z=253.0931 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$) und **b)** FaPy2N ($m/z=268.1040 \pm 0.004 [\text{M}+\text{H}]^+$) sowie die entsprechenden Koinjektions-Experimente mit den synthetisch dargestellten Standards.

Eine Überraschung stellte die schlechte Reaktivität des FaPy2N **20** dar. Dies könnte über die Konkurrenzreaktion mit dem Amin an Position 2 zu erklären sein. Wenn hier eine

Kondensation mit dem Zuckeraldehyd stattfindet, ist das Molekül nicht mehr in der Lage zu dem gewünschten Produkt zu reagieren. Bei der Zugabe von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ wurde hier im Verhältnis mehr β -f2N **10** als β -p2N **23** detektiert. Die Spektren dieser Reaktion waren jedoch größtenteils sehr unübersichtlich.

Beim Vergleich der verschiedenen Phosphat- und Carbonat-Salze mit den unterschiedlichen FaPys erzielte Magnesiumphosphat die besten Umsetzungen, da hier vorwiegend die saubersten Chromatogramme zu beobachten waren. Wird hingegen die Effektivität der Phosphate mit denen der Carbonate verglichen konnte ein deutlicher Trend zu den Carbonaten festgestellt werden. Unter den Carbonaten war Na_2CO_3 mit Abstand der Zusatz welcher die schlechtesten Ergebnissen lieferte, da entweder kaum die gewünschten Produkte detektiert werden konnte oder eine große Anzahl an Nebenprodukten entstand. Des Weiteren kann abgeleitet werden, dass mit der Anzahl an Carbonylsubstituenten die Effizienz der Glykosylierungsreaktionen der FaPys abnimmt. Wie in Tabelle 4 zu sehen, entstehen aufgrund der *Baeyer*-Spannung bevorzugt die Ribopyranose-Derivate.

Tabelle 4: Produktspektrum der Glykosylierungsreaktionen in Abhängigkeit des Salzzusatzes. p – Ribopyranose, f – Ribofuranose, – nicht detektiert, ✓ – detektiert, ✓✓ – unter den Hauptprodukten.

	FaPyA, 2		FaPyG, 13		FaPyDN, 16		FaPyHX, 18		FaPyN, 19		FaPy2N, 20	
Salz	p	f	p	f	p	f	p	f	p	f	P	f
-	✓✓	✓	-	-	✓✓	-	✓	-	✓✓	✓	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	✓✓	✓	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-
$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$	✓✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓	✓✓
$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$	✓✓	✓	✓	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓✓	✓✓	-	-
CaCO_3	✓✓	✓	✓✓	✓	✓✓	-	✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓	✓
$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	✓	✓✓	✓	✓	✓	-	✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓
Na_2CO_3	✓	-	-	-	-	-	✓✓	✓✓	✓	-	✓	✓

4.4.2 Darstellung von Guanosin und Nebularinanaloga unter Formose-ähnlichen Bedingungen

Die präbiotische Reaktion unter Formose-ähnlichen Bedingungen wurde ebenfalls für die Formamidopyrimidine FaPyG **13** und FaPyDN **16** durchgeführt. Da die Bildung von Xanthosin aus FaPyX **15** und Ribose nicht detektiert wurde, wurde von der Ankopplung an die Formose-Reaktion abgesehen. Wie in Tabelle 5 zu sehen ist, war auch unter den Formose-ähnlichen Bedingungen die Bildung gerade im Fall von Guanosin eingeschränkt und lediglich in Anwesenheit von Magnesiumphosphates (Eintrag 18) möglich. Bemerkenswerterweise wurde lediglich die D/L-Furanoseform **7** und nicht die Pyranoseform detektiert.

Die Bildung der Diaminonebularin-Nukleoside verlief günstiger. Hier bewirkte jedes getestete Salz eine Nukleosidbildung. Unter den Bedingungen (Eintrag 21) mit $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ wurde wieder lediglich die D/L-Furanoseform **9** und nicht die Pyranoseform detektiert.

Tabelle 5: Präbiotische Reaktionen mit FaPyG **13** und FaPyDN **16** unter formoseähnlichen Bedingungen. C1 – Formaldehyd, C2 – Glykolaldehyd Dimer, C3 – Glycerinaldehyd, Borax – $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$. ✓ – Bildung von entweder D/L-βf **7/9** oder D/L-βp **14/17**.

Nr.	FaPy [Äq]	Salz [Äq]	C1 [Äq]	C2 [Äq]	C3 [Äq]	Borax [Äq]	Ca(OH) ₂ [Äq]	t[h]/ T[°C]	β-f	β-p
16	G [1]	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	-	1	1	1	1	168/85	-	-
17	G [1]	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	1	1	1	1	1	336/85	-	-
18	G [1]	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ [1]	-	1	1	1	1	168/85	✓	-
19	G [1]	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ [1]	1	1	1	1	1	320/85	-	-
20	G [1]	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ [1]	1	1	1	1	1	320/85	-	-
21	DN [1]	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	1	1	1	1	1	320/85	✓	-
22	DN [1]	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1]	1	1	-	1	1	320/85	-	-
23	DN [1]	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ [1]	1	1	1	1	1	320/85	-	-
24	DN [1]	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ [1]	-	1	1	1	1	320/85	✓	✓
25	DN [1]	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ [1]	1	1	1	1	1	320/85	-	-
26	DN [1]	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ [1]	-	1	1	1	1	320/85	✓	✓
27	DN [1]	$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ [1]	1	1	1	1	1	320/85	✓	✓
28	DN [1]	$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ [1]	-	1	1	1	1	320/85	✓	✓

4.5 Imidazolringöffnung

Im vorangegangenen Kapitel konnte die Glykosylierung von Ribose mit FaPyA und FaPyG, sowie weiteren FaPys erfolgreich demonstriert werden. Die Zugänglichkeit von FaPys unter präbiotischen Bedingungen ist hierfür wesentlich.

Formamidopyrimidine sind in der Literatur als oxidative Schäden bekannt.^{71,79,80} *Saladino et al.*⁷⁰ zeigten die Möglichkeit mit TiO₂ aus 2-Desoxyadenosin FaPyA zu erhalten.

In Abbildung 24a ist der Umsatz von Adenin **1** zu FaPyA **2** über die Lewis-saure Hydrolyse mit TiO₂ oder unter Redoxbedingungen mit Riboflavin (Abbildung 24b) abgebildet. Es wurde die Masse von FaPyA detektiert und nach Koinjektion konnte bewiesen werden, dass es sich um FaPyA handelt.

FaPyG **13** konnte lediglich durch die Lewis-saure Hydrolyse von Guanin **24** mit TiO₂ beobachtet werden. Die Redoxreaktion mit Riboflavin führte auch bei Belichtung nicht zur Bildung von FaPyG. Bei der Belichtung mit weißem Licht wurde Guanin **24** vollständig in nicht weiter identifizierte Produkte zersetzt.

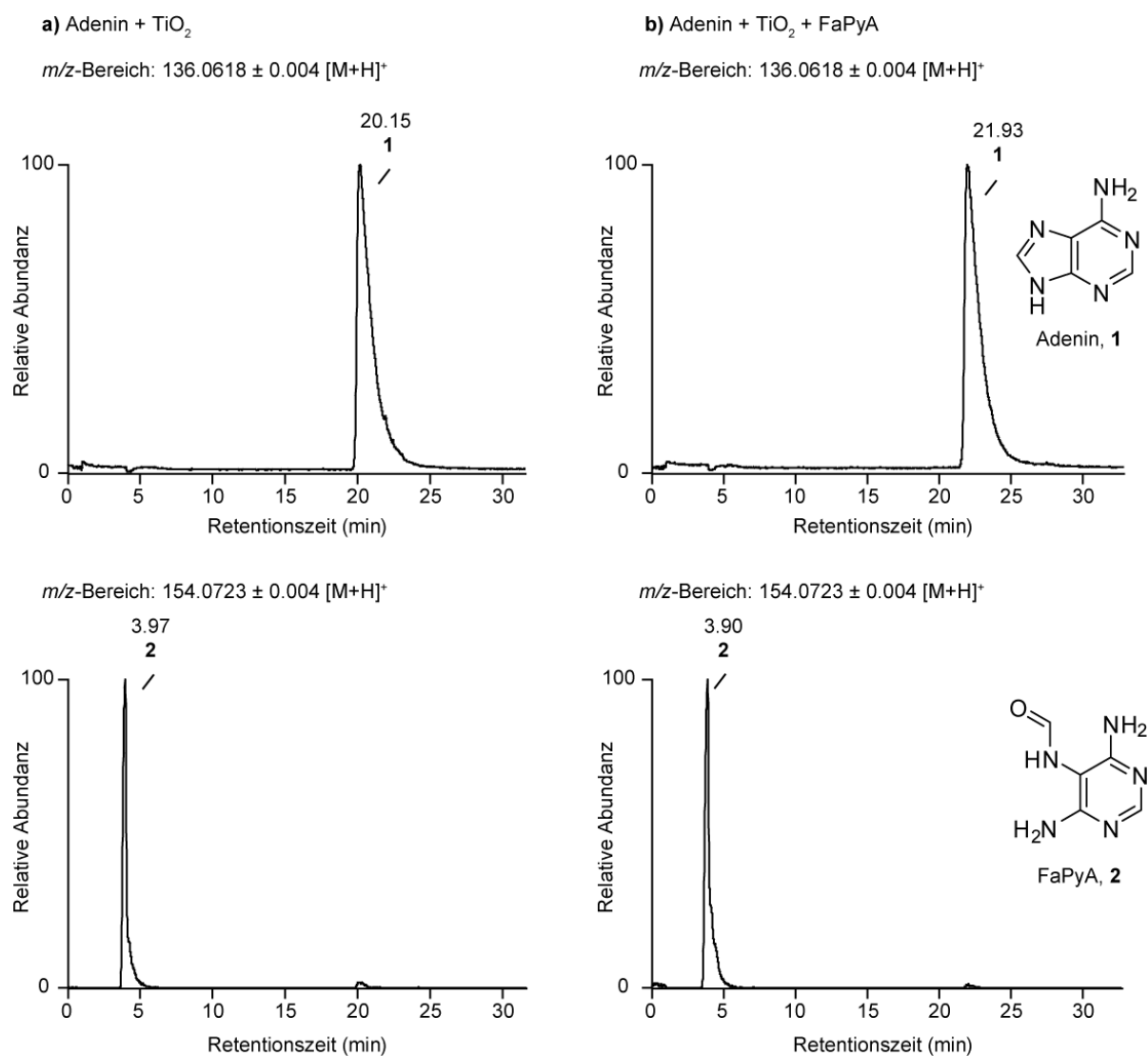


Abbildung 24: **a)** Reaktion von Adenin **1** mit TiO₂. Oben ist das LC-MS-Chromatogramm von Adenin und unten das von FaPyA **2** dargestellt. **b)** Reaktion von Adenin **1** mit TiO₂ und FaPyA **2** koinjiziert. Dargestellt sind die extrahierte Massenbereiche der protonierten Formen von Adenin **1** ($m/z=136.0618 \pm 0.004 [M+H]^+$) und FaPyA **2** ($m/z=154.0723 \pm 0.004 [M+H]^+$).

4.6 Synthesen

Zur Aufklärung der Produktmuster der präbiotischen Studien mussten Referenzmoleküle synthetisiert werden. Ebenfalls wurden Synthesewege zu den Formamidopyrimidine benötigt.

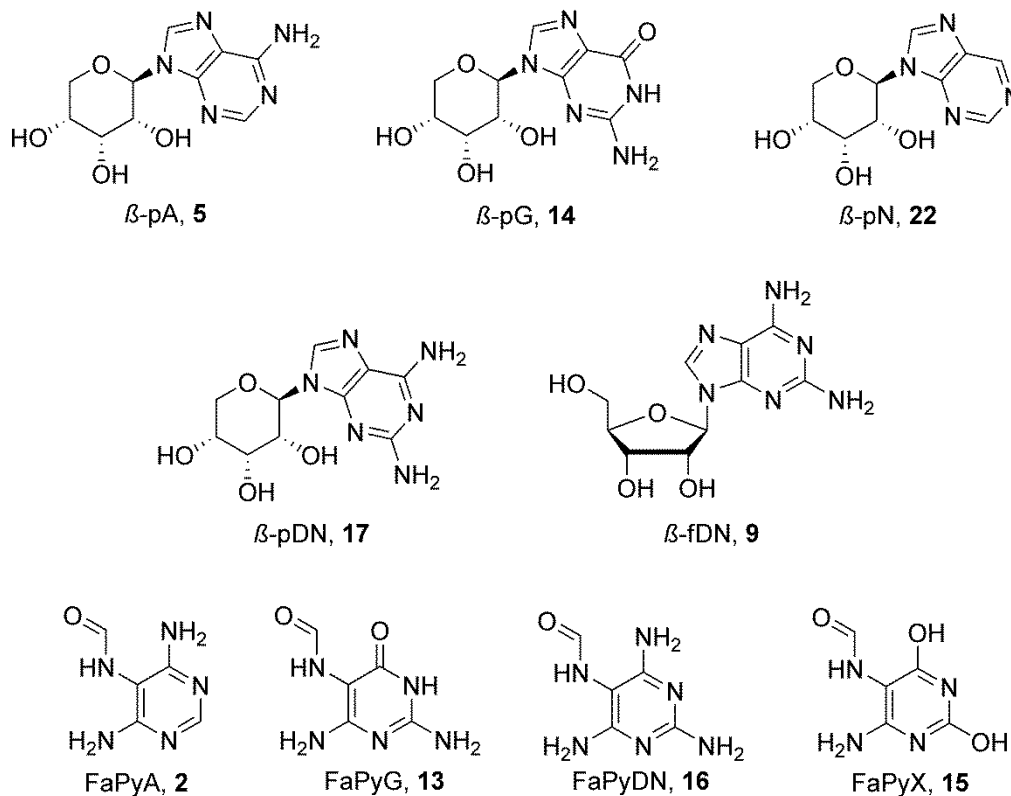
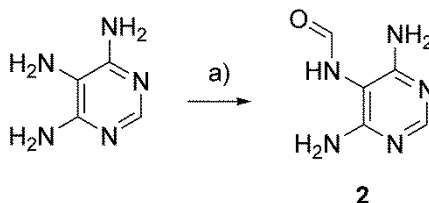


Abbildung 25: Zielmoleküle. β -Pyranosyladenosin (β -pA **5**), β -Pyranosylguanosin (β -pG **14**), β -Pyranosylnebularin (β -fN **22**), β -Furanosyldiaminonebularin (β -fDN **9**), β -Pyranosyldiaminonebularin (β -pDN **17**), 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FaPyA **2**), 2,4-Diamino-6-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPyG **13**), 2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin (FaPyDN **16**), 4-Amino-2,6-dihydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPyX **15**).

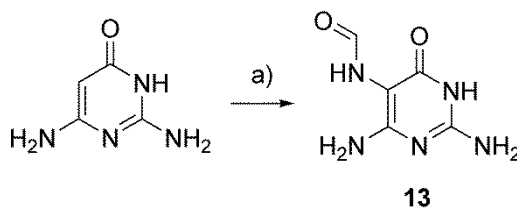
4.6.1 Synthesen der Formamidopyrimidine (FaPys)

FaPyA **2** konnte aus 4,5,6-Triaminopyrimidin synthetisch dargestellt werden. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur in Ameisensäure durchgeführt und das Rohprodukt aus Wasser umkristallisiert, um FaPyA **2** in 72% zu erhalten.⁸¹



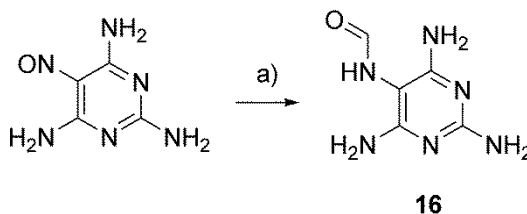
Schema 1: Synthese von FaPyA **2**. a) HCO₂H, HCl, rt, 7 d, 72%.

Die Darstellung von FaPyG **13** wurde analog zu der Synthese von *Pfleiderer*⁸² durchgeführt. 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin wurde zunächst mit Natriumnitrit nitrosiert. Die *in situ* entstandene Nitrosoverbindung wurde mit Natriumdithionit versetzt. Das Amin kondensierte mit der Ameisensäure zum gewünschten Formamidopyrimidin **13** mit einer guten Ausbeute von 73%.



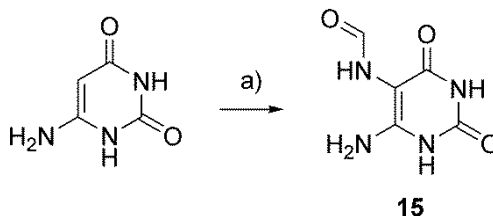
Schema 2: Synthese von FaPyG **13**. a) NaNO_2 , HCO_2H , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, HCONH_2 , $60\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 110\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h, 73%.

Für die Darstellung von 2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin **16** wurde von der Nitrosoverbindung 5-Nitroso-2,4,6-triaminopyrimidin die Formamidogruppe mit Palladium auf Aktivkohle und Ameisensäure eingeführt.⁸³ Der Weg über die *in situ* Darstellung stellte sich als weniger effektiv heraus, als die direkte Formylierung der Nitrosoverbindung. So wurde das gewünschte FaPyDN **16** mit einer guten Ausbeute von 79% erhalten.



Schema 3: Synthese von FaPyDN **16**. a) HCO_2H , H_2O , Pd/C (10%), NH_4HCO_2 , $100\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 79%.

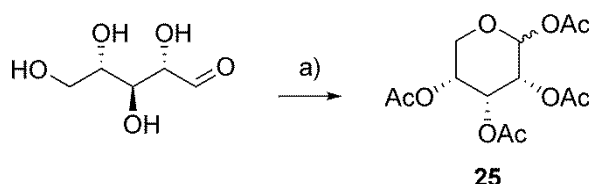
6-Amino-2,4-dihydroxy-5-formamidopyrimidin **15** wurde ebenfalls über die *in situ* Methode ausgehend vom 4-Amino-2,6-dihydroxypyrimidin mit Natriumnitrit und Ameisensäure in einer moderaten Ausbeute von 39% erhalten.⁸²



Schema 4: Synthese von FaPyX **15**. a) NaNO_2 , HCO_2H , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, HCONH_2 , $60\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 110\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h, 39%.

4.6.2 Glykosylierung

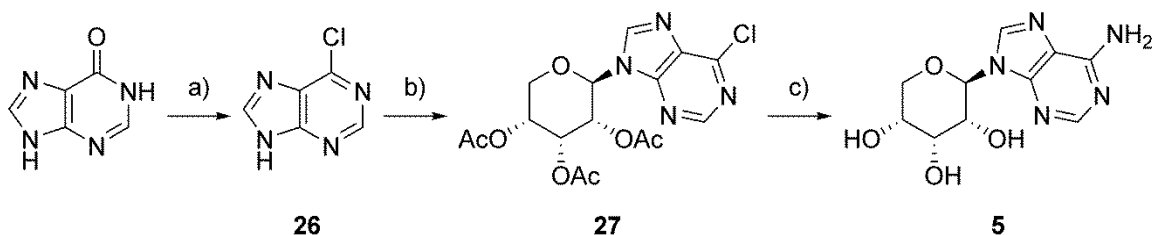
Als Zuckerdonor für die Glykosylierungen diente Acetyl-geschützte Pyranoseform **25**. Dieser wurde mittels Acetylierung hergestellt. Die Reaktion verlief analog zu Zinner⁸⁴ unter Kühlung zu dem gewünschten thermodynamisch günstigeren Sechsring. So konnte Ribose in die Acetyl-geschützte Pyranoseform **25** in einer exzellenten Ausbeute von 91% überführt werden.



Schema 5: Synthese von acetylgeschützter Ribopyranose **25**. a) Ac_2O , Pyridin, 0 °C, 18 h, 91%.

4.6.3 Synthese von β -Pyranosyladenosin β -pA (**5**)

Um eine bessere Regioselektivität zu erzielen, wurde zunächst 6-Chlorpurin **26** unter *Vorbrüggen*-Bedingungen^{85,86} mit Ribose **25** glykosyliert. Unter diesen Bedingungen wird die Bildung des β -Anomers bevorzugt, da der an C2-gebundene Ester nach Aktivierung mit einer Lewis-Säure an die C1-Position koordiniert und somit den α -Angriff blockiert.⁸⁷ 6-Chlorpurin wurde aus Hypoxanthin über eine Chlorierung mit Phosphorylchlorid bei 80 °C in einer sehr guten Ausbeute von 85% erhalten. Die Glykosylierung verlief mit einer guten Ausbeute von 57% und ergab das gewünschte β -Produkt Nukleosid **27**. In einem Druckrohr wurde Ammoniak einkondensiert, um Nukleosid **4** an Position 6 zu aminieren und gleichzeitig die Hydroxygruppen zu entschützen. Ausgehend von Ribose **2** und Hypoxanthin wurde β -Pyranosyladenosin **5** in einer Gesamtausbeute von 24% über vier Stufen erhalten.



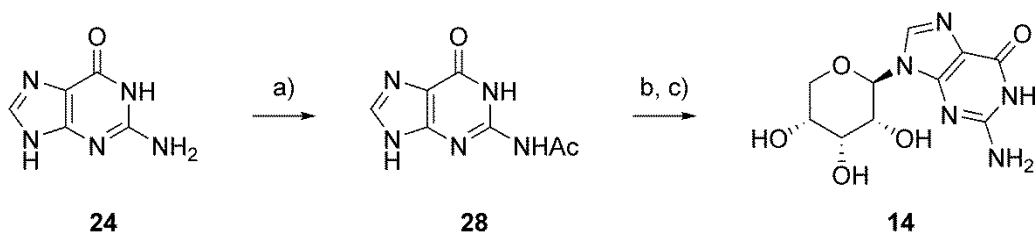
Schema 6: Synthese von β -pA. a) POCl_3 , 90 °C, 5 h, 85%; b) **25**, BSA, TMSOTf, MeCN, 55 °C, 18 h, 57%; c) NH_3 , rt, 48 h, 55%.

4.6.4 Synthese von β -Pyranosylguanosin β -pG (**14**)

Die Synthese von β -pG wurde ebenfalls ausgehend von Ribose **25** durchgeführt. Die direkte Glykosylierung von Ribose **25** mit Guanin **24** führte zu einem N7/N9-verknüpften acetylgeschützten Pyranosylguanosin-Gemisch mit lediglich 10% Ausbeute. Für eine Ausbeutenverbesserung wurde das Pivaloyl-geschützte und an Position 6 chlorierte Guanin eingesetzt. Die darauf folgende Glykosylierung zu dem entsprechenden Nukleosid verlief mit

einer guten Ausbeute von 53%. Die Entschützung der Pivaloyl-Gruppe erwies sich hingegen als ineffektiv. Auch bei Temperaturen bis zu 60 °C und Reaktionszeiten bis zu 14 Tagen und nach Zugabe von Wasser zu der Reaktion in methanolischem Ammoniak war das exozyklische freie Amin nicht zu detektieren.

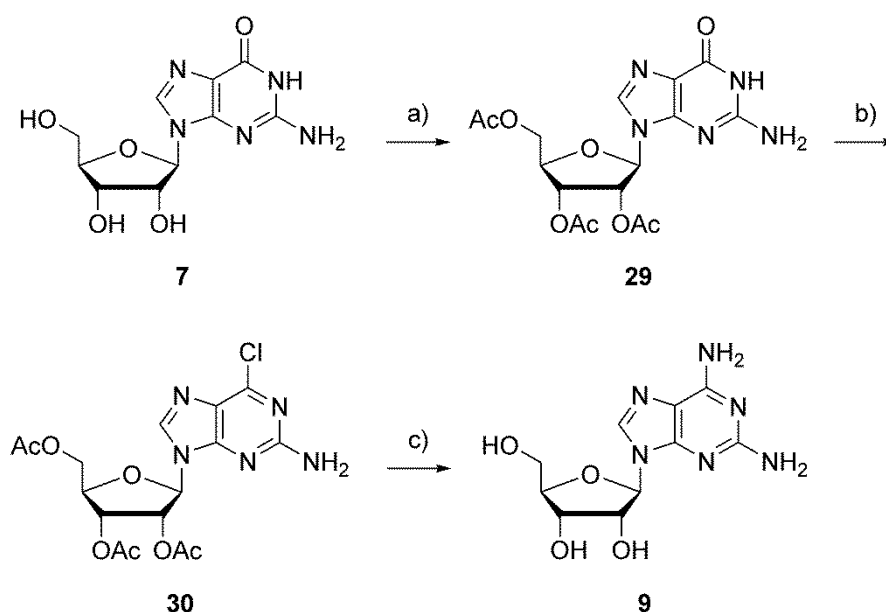
Um die Ausbeute zu verbessern wurde zunächst die exozyklische Aminogruppe von Guanin **24** in siedendem DMAC mit Essigsäureanhydrid mit einer guten Ausbeute von 72% zum *N*-2-Acetylguanin **28** geschützt.⁸⁸ Die darauf folgende Glykosylierung wurde analog zur Synthese von Nukleosid **27** durchgeführt. Das Produkt wurde ammoniakalisch entschützt und β -pG **14** mit 36% über vier Stufen erhalten.



Schema 7: Synthese von β -Pyranosylguanosin **14**. a) Ac_2O , DMAC, 160 °C, 48 h, 72%; b) Ribose **25**, BSA, TMSOTf, MeCN, 55 °C, 18 h; c) NH_3 in MeOH, rt, 18 h, 55% in zwei Schritten.

4.6.5 Synthese der β -2,6-Diaminonebularinderivate β -fDN (46) und β -pDN (17)

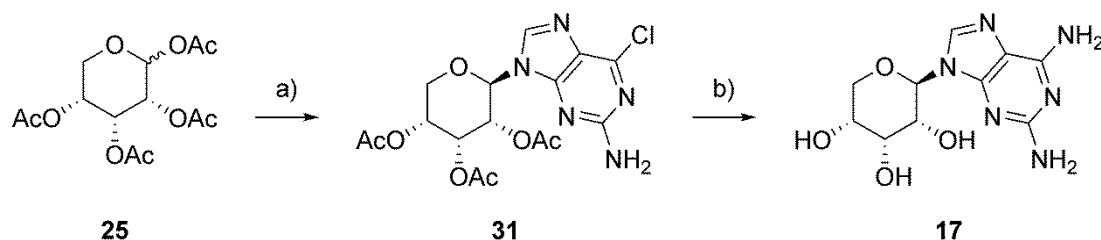
Für die Synthese von β -fDN wurde zunächst Guanosin **7** Acetyl-geschützt, um dreifach acetyliertes Guanosin **29** mit 95% Ausbeute zu erhalten. Die C6-Position von **29** konnte durch Verwendung von Phosphorylchlorid mit einer sehr guten Ausbeute von 87% zu Nukleosid **30** chloriert werden.⁸⁹ In einkondensiertem Ammoniak wurde Chlor an Position C6 zum Amin substituiert und die Hydroxygruppen gleichzeitig entschützt. Ausgehend von Guanosin wurde 2,6-Diaminonebularin **9** in drei Stufen mit einer Ausbeute von 55% erhalten.



Schema 8: Synthese von β -2,6-Furanosyldiaminonebularin **9**. a) Ac_2O , DMAP, 40 °C, 48 h, 95%; b) Et_4NCl , DMA, POCl_3 , MeCN, 100 °C, 10 min, 87%; c) NH_3 , rt, 48 h, 67%.

Die Pyranoseform sollte zunächst ebenfalls über die Pivaloyl-geschützte und Chlor-substituierte Base synthetisiert werden. Doch auch hier konnte am Ende die Pivaloyl-Schutzgruppe nur zu 5% entfernt werden, sodass primär das Pivaloyl-geschützte β -pDN isoliert wurde.

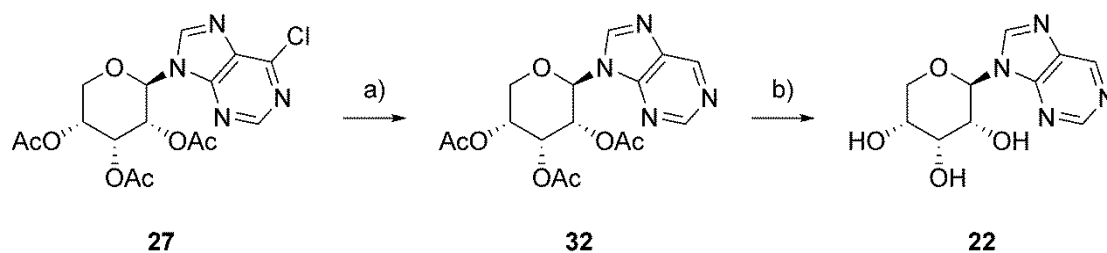
Daher wurde 6-Chlorguanin mit acetyl-geschützter Ribose **25** glykosyliert, um Nukleosid **31** mit 44% Ausbeute zu erhalten. Auch in diesem Fall wurde die Substitution und Entschützung in einem Schritt mit Ammoniak mit 63% Ausbeute durchgeführt. Ausgehend von Ribose wurde β -pDN **17** in drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 26% erhalten.



Schema 9: Synthese von β -2,6-Pyranosyldiaminonebularin **17**. a) 6-Chlorguanin, BSA, TMSOTf, MeCN, 55 °C, 18 h, 44%; b) NH_3 , rt, 48 h, 64%.

4.6.6 Synthese von β -Pyranosylnebularin β -pN (**22**)

Um β -pN zu erhalten wurde Nukleosid **27** mit Palladium auf Kohlenstoff mit einer exzellenten Ausbeute von 94% hydriert.⁹⁰ Die Acetyl-Schutzgruppen von Nukleosid **32** konnten in methanolischem Ammoniak entfernt werden. Diese Sequenz ergab β -Pyranosylnebularin **22** mit einer guten Ausbeute von 65%. β -pN **22** wurde somit ausgehend von Ribose und Hypoxanthin über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 27% erhalten.



Schema 10: Synthese von β -Pyranosylnebularin **22** ausgehend von Nukleosid **27**. a) Pd/C, MgO, H_2 , MeOH/THF (2:1), rt, 1 h, 94%; b) NH_3 in MeOH, rt, 18 h, 65%.

4.7 Ausblick

Nachdem nun eine Möglichkeit gefunden wurde im wässrigen Milieu eine präbiotische Glykosylierung zu finden, könnten Versuche unternommen werden, die Ausbeuten mit Hilfe einer Verschiebung des *Le Chatelier* Gleichgewichts zu verbessern. Dazu könnten Fällungsexperimente herangezogen werden. So könnte über lokale Anreicherungen des Nukleosids die Ausbeute gesteigert werden.

Ferner können weitere Salze getestet werden, sowie die Kombination verschiedener Salze. Es wurde bereits eine Auswirkung der Salze auf die präbiotischen Glykosylierungen gezeigt. Es ist nicht auszuschließen, dass die optimalen Salz-Zusätze noch nicht gefunden wurden. Diese könnten sich sowohl auf die Ausbeute, als auch auf die Anzahl an Nebenprodukten, sowie die Produktverhältnisse auswirken. In diesem Zusammenhang könnten z.B. Untersuchungen mit Eisensulfid-Mineralien durchgeführt werden. Die Theorie der Eisen-Schwefel-Welt nach *Wächtershäuser*⁹¹ wurde in dieser Arbeit noch nicht berücksichtigt. Eisensalze könnten aber im Hinblick auf deren katalytische Eigenschaften eine interessante Alternative zu den bislang getesteten Salzen darstellen.

Ferner wären Experimente mit Micellen denkbar.¹³ Hierfür müssten Bedingungen gefunden werden, bei denen die präbiotische Glykosylierung und die Formose-Reaktion ablaufen können, die Micellen jedoch nicht zerfallen.

5 Ribonukleinsäure – RNA

Auf die Signifikanz des Biopolymers RNA, sowie präbiotische Wege RNA darzustellen, wurde bereits in Kapitel 3.4 verwiesen. Im Organismus wird RNA über Transkription aus der Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid* – DNA), dem Speichermedium für die Erbinformation,⁹² synthetisiert. Der RNA-Strang ist aus Ribose (Ribonukleinsäure), einer Nukleobase (Ribonukleinsäure) und dem 5'-verknüpfenden Phosphorsäurediester (Ribonukleinsäure) aufgebaut.⁹³ Grundsätzlich besteht RNA aus den vier Nukleosiden Adenosin (A), Guanosin (G), Uridin (U) und Cytidin (C). Die jeweiligen Nukleobasen, die Erkennungs-Einheiten,⁹⁴ Adenin, Guanin, Uracil und Cytosin gehen unter anderem *Watson-Crick* Basenpaarung ein (Abbildung 26).^{95,96}

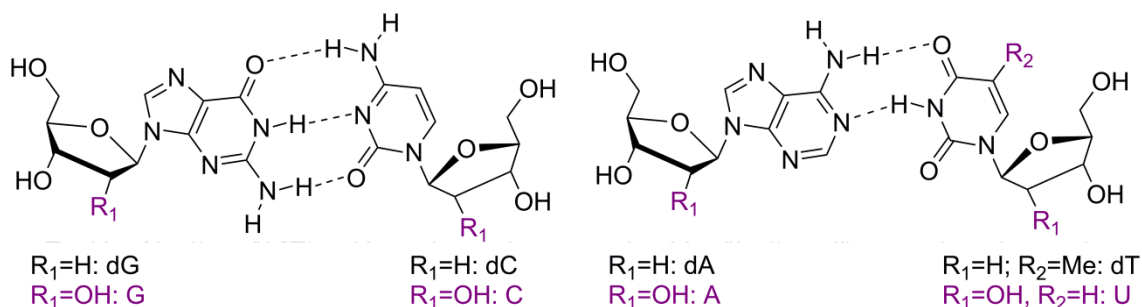


Abbildung 26: DNA- und RNA-Basenpaarungen. DNA – 2'-Desoxyribose, keine Alkoholgruppe an der C2'-Position und Thymin. RNA – Ribose, besitzt eine Alkoholgruppe an der C2'-Position und Uracil. Die strukturellen Unterschiede sind lila hervorgehoben.

Trotz der auf dem ersten Blick hohen strukturellen Ähnlichkeit zur DNA gibt es zahlreiche Unterschiede. Dazu gehören unter anderem die zusätzliche 2'-Hydroxygruppe, und die Tatsache, dass die Base Thymin durch Uracil als kanonische Nukleobase in der RNA ersetzt wird. RNA kommt in vielen verschiedenen Unterarten vor und existiert eher als Einzelstrang. Ferner enthält RNA viele modifizierte Nukleobasen.⁹⁷

5.1 RNA-Modifikationen

Modifikationen von Nukleobasen reichen von einfachen Methylierungen⁹⁸ bis hin zu hypermodifizierten Varianten wie dem Queuosin **33** (vgl. Abbildung 27). Ebenfalls kann die 2'-Hydroxygruppe der Ribose modifiziert vorliegen. Datenbanken* geben einen Überblick über die zahlreichen Modifikationen. Modifikationen wie Pseudouridin Ψ und Inosin I treten

* <http://modomics.genesilico.pl/> und <http://mods.rna.albany.edu/>

in allen drei Domänen des Lebens⁹⁹ (Eukaryoten, Prokaryoten und Archaeen) auf. Queuosin Q (Eukaryoten/Prokaryoten) und 2-Methyladenosin m²A **34** (Prokaryoten/Archaeen) sind Beispiele für Modifikationen die in zwei Domänen vorkommen. Doch der Großteil ist nur in einer Domäne (z.B. Epoxyqueuosin, oQ **35** (Prokaryoten) und 2'-O-Ribosyladenosin(phosphat), A(p) (Eukaryoten)) zu finden.⁹⁷

Ebenso können die Modifikationen nach den verschiedenen RNA-Spezies in denen sie vorkommen eingeteilt werden. So fällt auf, dass in der Transfer-RNA (tRNA) mit über 90 Modifikationen die Meisten identifiziert wurden. Unter den Nukleosiden sticht Uridin (U) mit über 40 Modifikationen heraus. U ist damit um 20 Modifikationen reicher als Adenosin. Beachtlich sind ebenso die 7-Desazaguanosine, welche an sich schon Varianten des Guanosins sind und das Grundgerüst weiterer Modifikationen darstellen. Die 7-Desazanukleoside befinden sich alle, bis auf das Archaeosin (G⁺, Position 15), in der *Wobble* Position (Position 34).¹⁰⁰

Untersuchungen haben bereits ergeben, dass Modifikationen unter anderem für die Stabilität, die Faltung der Sekundär und Tertiärstruktur und somit auch für die jeweilige Funktionalität der tRNAs, sowie der Genexpression, wichtig sind.^{101,102} Die Lokalisierung und Quantifizierung der Modifikationen in RNA-Spezies und Geweben wurde in den letzten Jahren stetig ausgebaut.¹⁰³⁻¹⁰⁶ So konnten Unterschiede im Modifikationslevel zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien gefunden, sowie ein phylogenetischer Baum bezogen auf das Modifikationsniveau erstellt werden.¹⁰⁷ Ebenfalls wurde herausgefunden, dass es einen Zusammenhang zwischen Translationseffizienz und tRNA-Modifikationsgrad gibt.¹⁰⁸

Dank neuer Technologien wie der Kopplung von Flüssigchromatographie gekoppelt an Massenspektroskopie (LC-MS) und milderer Präparationsmethoden können noch immer neue Modifikationen detektiert werden. So wurden in den letzten Jahren unter anderem die in Abbildung 27 und Abbildung 30 abgebildeten Modifikationen Agmatidin (C⁺)^{109,110}, Glutamyl-Queuosin (gluQ, **36**)^{111,112} und 5-Taurinomethyluridin (tm⁵U)¹¹³ entdeckt. Agmatidin (C⁺) ist verwandt mit Lysidin, welches an der Carbonylgruppe von Cytidin mit der ε-Aminogruppe von Lysin verbunden ist.

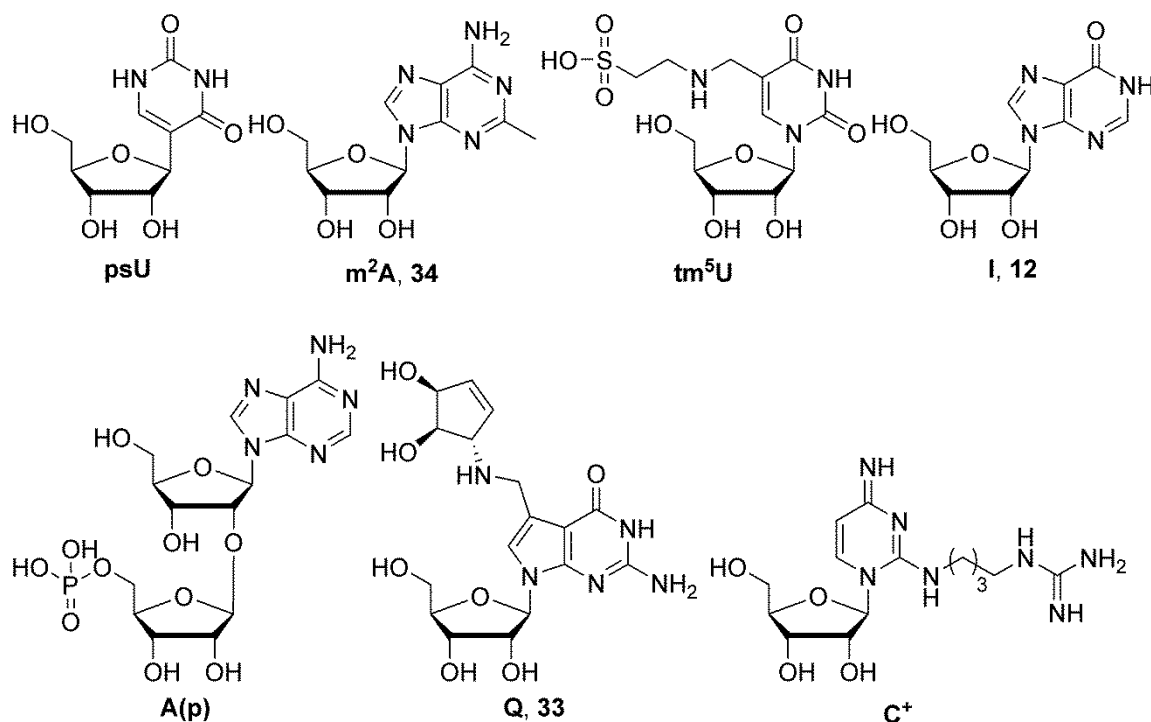


Abbildung 27: Verschiedene RNA-Modifikationen. psU (auch Ψ) – Pseudouridin, m₂A – 2-Methyladenosin, tm₅U – 5-Taurinomethyluridin, I – Inosin, A(p) – 2'-O-Ribosyladenosin(phosphat), Q – Queuosin, C⁺ – Agmatidin.

5.2 Transfer-RNA, tRNA

Die tRNA ist mit ihrer Transporttätigkeit essentiell für die Proteinsynthese. Sie ist aus 73 – 95 Nukleotiden aufgebaut. Die tRNA ist aus vier Stämmen und vier Schleifen zusammengesetzt, welche in der zweidimensionalen Struktur einem Kleeblatt ähnelt (Abbildung 28a). Ausgehend vom 3' Ende setzt sich die tRNA aus Akzeptorstamm, T Ψ C-Arm, variable Schleife, Antikodonstamm und Dihydrouridin-Arm (D-Arm) zusammen. Der Akzeptorstamm verknüpft das 3' - und das 5' -Ende über Basenpaarungen. Das 3' -Ende besitzt immer die Basensequenz CCA und bindet die Aminosäuren welche später zum Peptid verknüpft werden. Der T Ψ C-Arm hat seinen Namen aus der für diesen Stamm typischen Basenabfolge Thymin-Pseudouridin-Cytosin. Die variable Schleife besteht aus verschiedenen vielen Basen. Der Antikodonstamm enthält das Antikodon (Position 34 – 36). Dieses erkennt das Kodon auf der *messenger*-RNA (mRNA) und besitzt somit die Fähigkeit, die richtige Reihenfolge der Aminosäuresequenz zu dekodieren. Der D-Arm hat seinen Namen von der Modifikation Dihydrouridin, da diese dort immer mindestens einmal zu finden ist. Über Basenpaarungen und weitere Wasserstoffbrücken liegt die tRNA dreidimensional in der sogenannten L-Form vor (Abbildung 28b). Hierbei befinden sich Akzeptorstamm und Antikodon an den entgegengesetzten Enden der L-Schenkel.

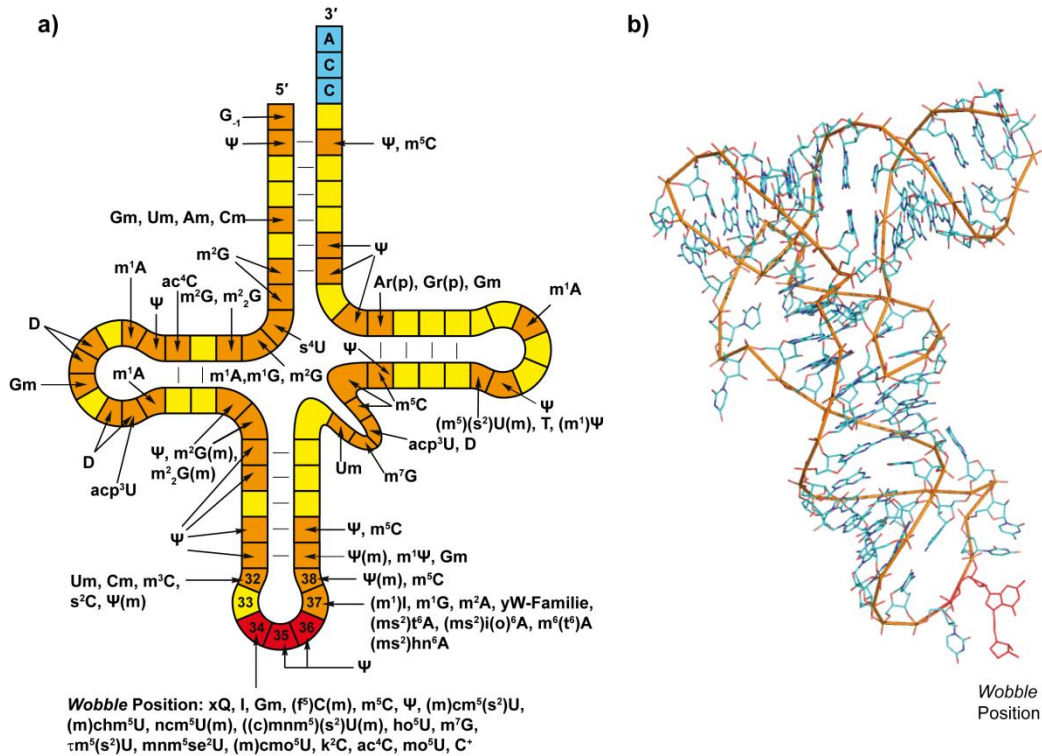


Abbildung 28: a) Die 2D-Kleeblattstruktur der tRNA. Das Antikodon ist rot hervorgehoben und an Position 34 die *Wobble* Position markiert. Ferner wurden für Modifikationen typische Positionen gekennzeichnet (orange). Mit Erlaubnis von *John Wiley & Sons, Inc.*⁹⁷ b) Die L-förmige dreidimensionale Struktur mit Queuosin **33** in rot an der *Wobble* Position.^{114,115}

5.3 Wobble-Position

In der Antikodonschleife treten modifizierte Nukleoside am häufigsten auf (vergl. Abbildung 28a). Besonders die *Wobble* Position¹¹⁶ (Position 34) und Position 37, eine Base 3' neben dem Antikodon, sind stark modifiziert. Die *Wobble* Position spielt in der Kodondegenerierung eine bedeutende Rolle. Das Antikodon auf der tRNA besteht aus den Nukleosiden auf Position 34-36. Diese erkennen das Kodon auf der mRNA, und können so die Proteinsynthese durchführen. Das Kodon besteht aus einem Basentriplett und kann somit 64 verschiedene Triplets bilden. Da es drei Stopkodons gibt bleiben noch 61 Triplets, welche lediglich 20 Aminosäuren kodieren müssen.¹¹⁷ Folglich sind mehrere tRNA pro Aminosäure denkbar. Es wurde jedoch herausgefunden, dass es etwa 40 und nicht 61 tRNAs in einer Zelle gibt.¹¹⁸ Somit entstand die *Wobble*-Hypothese. Diese besagt, dass durch „hinauswackeln“ der Basen mehrere Kodons gelesen werden können. Da dies nur die dritte Base des Triplets auf der tRNA betrifft, spricht man hierbei von der *Wobble*-Position (engl. *wobble* – wackeln). Diese Basenpaarungen weichen von den *Watson-Crick* Basenpaarungen ab und gehen eine *Wobble*-Paarung ein. So kann z.B. die Modifikation Inosin nicht nur mit Cytosin, sondern auch mit Adenin und Uracil paaren.¹¹⁶

Ist an Position 34 Q **33** statt G **7** kann die entsprechende tRNA Kodons der Basenabfolge NAC und NAU (Abfolge 5'-3'; N steht für A, G, U oder C) lesen. Im Gegensatz dazu bevorzugt eine tRNA mit G an Position 34 ein Kodon, welches auf C endet.¹¹⁹

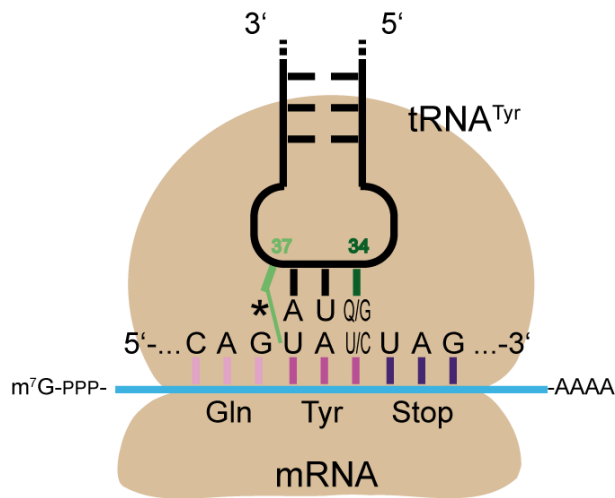


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Antikodon-Kodon-Wechselwirkung. Die *Wobble* Position (Position 34 – dunkel grün) kann mit U und C paaren wenn sich an dieser Position Q (**33**) befindet.⁹⁷ In blau ist die mRNA mit dem Poly(A)-Schwanz und in braun ist das Ribosom dargestellt.

5.4 7-Desazamodifikationen

7-Desazaguanosine sind Modifikationen, welche an der Position 7 ein Kohlenstoff- statt einem Stickstoffatom besitzen. Sie kommen in allen Domänen, außer in Bäckerhefe und Mykoplasmen, vor. In Archaeen wird Archaeosin (vgl. Abbildung 30, G⁺) gefunden, welches an Position 7 um eine Carboxyamidinfunktion erweitert ist. Archaeosin befindet sich in der tRNA an Position 15 und ist vermutlich für die Stabilität der tRNA verantwortlich.¹²⁰ In Eukaryoten und Prokaryoten kommen Queuosin (Abbildung 27) und seine Derivate vor. Sie befinden sich stets in der *Wobble*-Position. Queuosin wurde 1968 in tRNA^{Tyr} und vier Jahre später zusätzlich in tRNA^{His}, tRNA^{Asn} und tRNA^{Asp} entdeckt.^{121,122} Die Struktur konnte schließlich von *Kasai et al.* aufgeklärt.¹²³

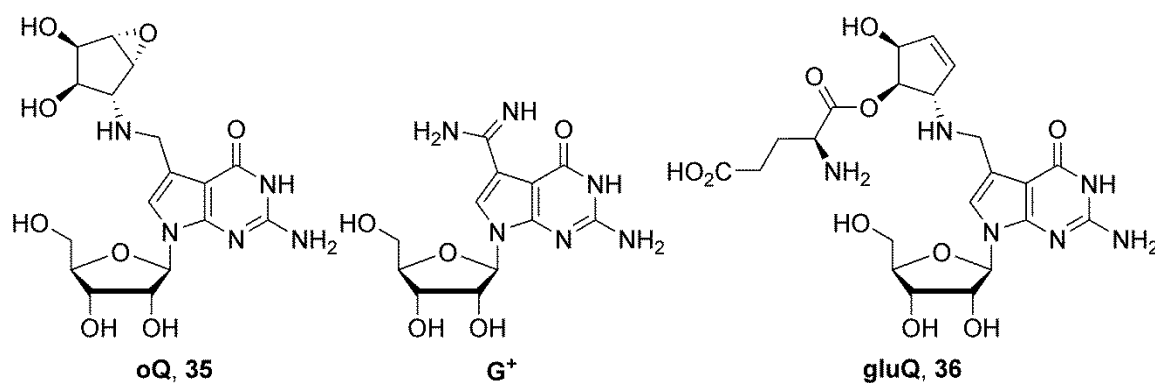


Abbildung 30: 7-Desazaguanosinmodifikationen. oQ – Epoxyqueuosin **35**, G⁺ – Archaeosin, gluQ – Glutamylqueuosin **36**.

In Tabelle 6 ist aufgelistet, in welchen Domänen sich welche 7-Desazaguanosine befinden, wobei es sich bei preQ0, preQ1 **37** und Epoxyqueuosin oQ **35** um Biosynthesevorläufer handelt.

Tabelle 6: Übersicht der 7-Desazaguanosin-Vorkommen in den Domänen.⁹⁷

Abkürzung	Trivialname	Archaeen	Prokaryoten	Eukaryoten
G ⁺	Archaeosin	✓	-	-
preQ0	-	✓	-	-
preQ1	-	-	✓	-
oQ	Epoxyqueuosin	-	✓	-
Q	Queuosin	-	✓	✓
galQ	Galaktosyl-Queuosin	-	-	✓
manQ	Manosyl-Queuosin	-	-	✓
gluQ	Glutamyl-Queuosin	-	✓	-

Queuosin kann lediglich von Prokaryoten *de novo* synthetisiert werden. Eukaryoten sind somit darauf angewiesen die Base Queuin über die Nahrung aufzunehmen. Queuin wird mit Hilfe einer speziellen tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) gegen die Base Guanin ausgetauscht.¹²⁴⁻¹²⁶

Die Biosynthese von Queuosin wurde ausführlich erforscht¹²⁰ und bringt unter anderem interessante Teilschritte, wie den Aufbau der Cyclopentandiol-Einheit aus S-Adenosylmethionin (SAM, vgl. Abbildung 31) mit sich.¹²⁷ In diesem Schritt dient SAM als Ribose-Donor. Es wird über ein Schwefelylid in das Cyclopentan, des 1987 entdeckten Epoxyqueuosins (Abbildung 30), überführt.^{128,129} Im finalen Schritt wird über ein Vitamin B12 abhängiges Enzym das Epoxid zur Doppelbindung umgewandelt.¹³⁰ Die hierfür notwendige Eisen-Schwefel-Reduktase, deren Struktur noch nicht bekannt ist, wurde erst kürzlich in der Gruppe um *Bandarian* entdeckt.¹³¹

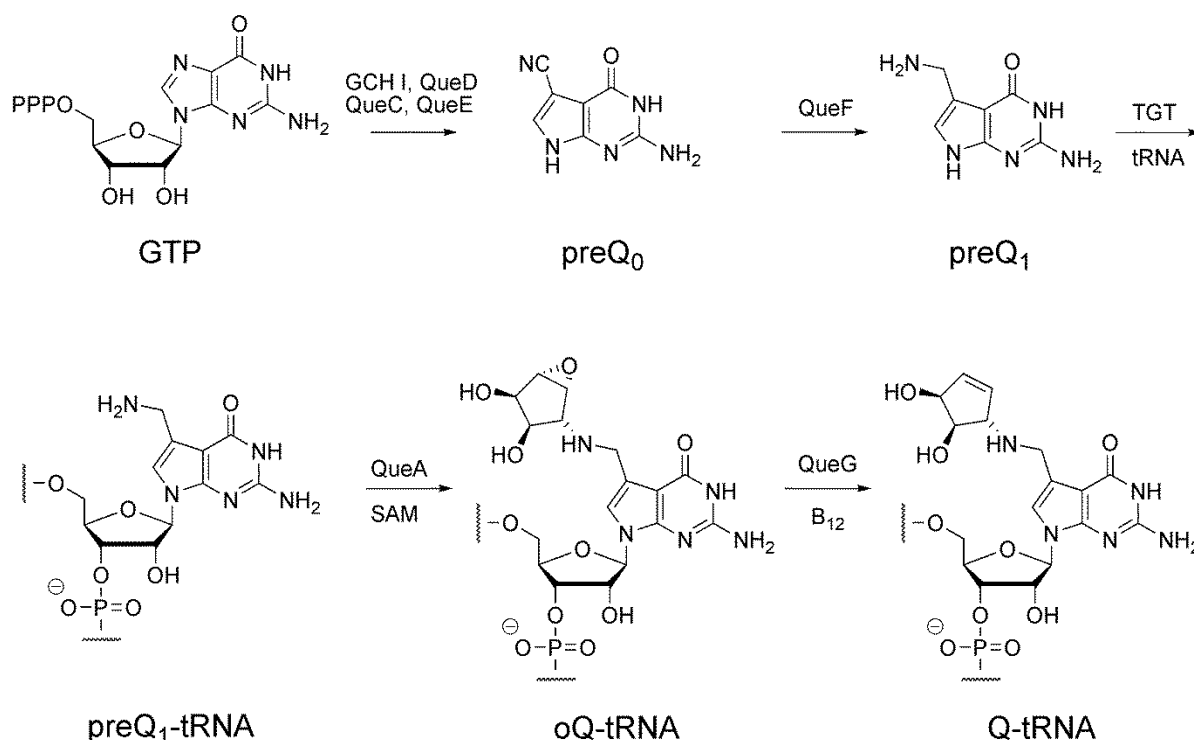


Abbildung 31: Biosynthese zu Queuosin **33** in den Prokaryoten.¹²⁰

In höheren Modifikationen von Q sind die Aldohexosen Galaktose (galQ) und Mannose (manQ) über die Alkohole am Cyclopentenring gebunden. Diese β -verknüpften Q-Derivate treten nur in Tieren auf.^{132,133} Das in Abbildung 30 abgebildete, höhermodifizierte Q-Derivat gluQ ist hingegen nur in den Aspartat kodierenden tRNAs (tRNA^{Asp}) von *Escherichia coli* (*E. coli*) zu finden. Die zusätzliche L-Glutamylgruppe ist voraussichtlich an einem der beiden Alkohole des Cyclopenten-Rests über die Glutamyl-Queuosin-tRNA^{Asp} Synthetase (Glu-Q-RS, veraltet: YadB) verestert. Glu-Q-RS weist eine 34%ige Sequenzhomologie mit der Glutamyl-tRNA-Synthetase auf.^{111,112} Blaise *et al.* zeigten anhand von Mutationsanalysen an tRNA^{ASN} und tRNA^{Asp}, dass die Anwesenheit von C in Position 38 in der Antikodonschleife eine entscheidende Rolle für die Glutamylierung spielt.¹³⁴ Ferner haben Caballero *et al.* publiziert, dass unter osmotischem Stress die Anwesenheit von gluQ zum Überleben des humanpathogenen *Shigella flexneri* wichtig ist.¹³⁵

5.5 Q in Bezug auf Krankheiten

Queuosin wird in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen gebracht. Vor allem wurde beobachtet, dass in Krebszellen ein niedrigerer Q-Gehalt als in gesunden Zellen vorliegt.^{136,137} Ebenso wird ein abnehmender Q-Level mit höheren Expressionsraten einer TGT-Untereinheit in leukämischen und Kolonkarzinomzellen beobachtet.¹³⁸ Rakovich *et al.* untersuchten die Auswirkung einer Störung der TGTs und einem darauf folgenden Q-Mangel

in HepG2-Zellen und Mäusen und detektierten eine Einschränkung in der Produktion von Tyrosin und Phenylalanin. Dies steht im Zusammenhang mit der Stoffwechselstörung Phenylketonurie.¹³⁹ Abschließend wird vermutet, dass Queuin als Antioxidans verwendet werden könnte, um das Antioxidans Abwehrsystem während der Zellwucherung zu schützen.¹⁴⁰

Da 7-Desazaguanosine nicht nur eine Rolle in der Kodondegenerierung und der Stabilisierung sondern auch in Krankheitsbildern zu spielen scheinen, ist es wichtig, sich weiter mit diesen Hypermodifikationen auseinander zu setzen. Folglich müssen neben den bereits bestehenden Synthesen zu Queuosin¹⁴¹⁻¹⁴³ und andere 7-Desazaguanosinen¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ effizientere und neue Synthesen ausgearbeitet werden, um weitere Experimente durchführen zu können.

6 Synthese und Untersuchungen von tRNA Modifikationen

6.1 Aufgabenstellung

Die Aufgaben modifizierter Nukleoside werfen noch immer viele Fragen auf. Obwohl schon zahlreiche Funktionen entschlüsselt werden konnten, scheint die große Anzahl an natürlichen Modifikationen in den RNA Molekülen ein Hinweis darauf zu sein, dass noch lange nicht alles entdeckt wurde. Modifikationen am Antikodon und an benachbarten Positionen der tRNA stehen unter besonderer Beobachtung. Da die *Wobble*-Position des Antikodons eine signifikante Rolle in der Translation spielt und im Vergleich zu anderen Positionen dramatisch häufig modifiziert vorliegt, ist das Interesse an den Modifikationen, welche sich an dieser Stelle befinden, besonders groß. Ganz besonderes Interesse genießen die 7-Desazaguanosinderivate, wie Queuosin, welche sich fast ausschließlich in der *Wobble*-Position befinden.

Der direkte Biosynthesevorläufer von Queuosin ist Epoxyqueuosin. Da lediglich Prokaryoten in der Lage sind, Queuosin *de novo* herzustellen, ist die Biosynthese zu Queuosin und somit deren Zwischenstufen von Interesse.

Es konnten noch immer nicht alle Derivate synthetisch dargestellt werden, um postulierte Strukturen zu bestätigen.

Ziel dieser Arbeit war es das natürliche, hypermodifizierte Nukleosid Epoxyqueuosin synthetisch herzustellen, sowie die Bestätigung der postulierten Struktur über Koinjektions-Experimente mit Hilfe von HPLC-MS.

Daneben sollte eine verbesserte Syntheseroute zu einem anderen Biosynthesevorläufer, dem preQ1, gefunden werden.

6.2 Synthese von hypermodifizierten 7-Desazaguanosinderivaten

6.2.1 Synthese von Epoxyqueuosin oQ (35)

Die Synthesestrategie zu Epoxyqueuosin **35** wurde aufbauend auf der bereits bekannten Synthese von Queuosin **33** ausgearbeitet.¹⁴¹ Zunächst sollte das 7-Desazaguanosin-Grundgerüst aufgebaut werden, um über eine reduktive Aminierung den Cyclopentanbaustein einführen zu können (Abbildung 32).

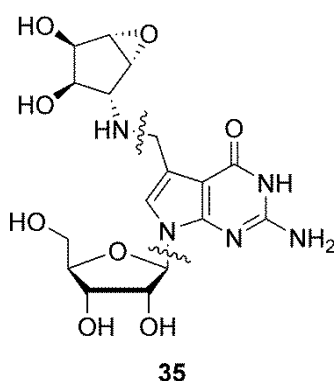
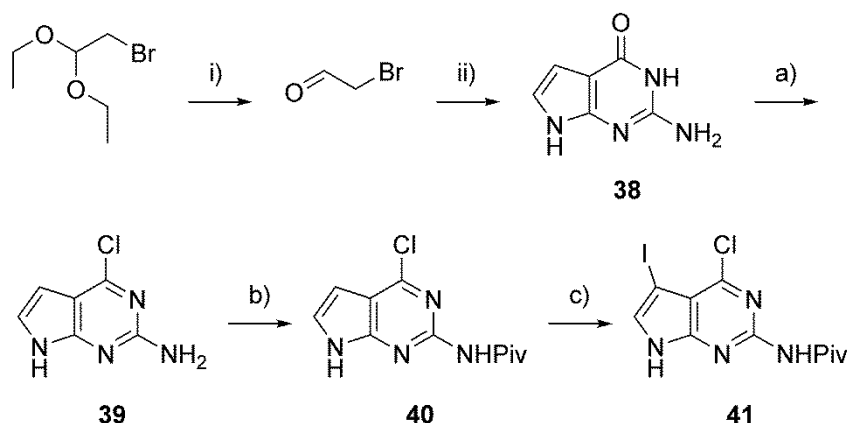


Abbildung 32: Retrosynthetische Schnitte in drei Grundbausteine bei der Synthesepanung zu oQ.

Bei der Planung musste eine mögliche *Payne*-Umlagerung bedacht werden.¹⁴⁷ Folglich durfte der letzte Schritt in der Synthese keine basische Entschützung sein, da das Epoxid geöffnet werden könnte und somit die Stereoinformation verloren ginge.

6.2.1.1 Synthese von 7-Desazaguanin 41

7-Desazaguanin **38** war über eine Kondensation von 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin mit Bromacetaldehyd zugänglich. Der Aldehyd wurde zunächst *in situ* aus Bromacetaldehyddiethylacetal generiert, um ihn in der Folgereaktion mit dem Pyrimidin zu kondensieren. So wurde 7-Desazaguanin **38** in einer guten Ausbeute von 74% erhalten.¹⁴⁵ Die darauf folgende Chlorierung mit Phosphorylchlorid ergab Desazaguanosinderivat **39**, dass als Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde. Um Desazaguanosinderivat **40** zu erhalten wurde das exozyklische Amin in Pyridin mit Pivaloylchlorid geschützt.¹⁴⁸ Die darauf folgende Iodierung mit NIS ergab Iodbase **41** in 87%.¹⁴¹



Schema 11: Synthese zu Iodbase **41**. i) HCl, H₂O, 90 °C, 0.5 h; ii) NaOAc, 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin, H₂O, 80 °C, 2 h, 74%; a) POCl₃, 90 °C, 4 h, 80%; b) PivCl, Pyridin, rt, 4 h, 45%; c) NIS, THF, rt, 1 h, 87%.

6.2.1.2 Synthese von Cyclopentan **43**

Ausgehend von Cyclopenten **42** konnte in drei Schritten die gewünschte Epoxyverbindung **43** synthetisiert werden. Zunächst wurde die Acetonid-Schutzgruppe in Essigsäure (70%) entfernt, um das entstandene Rohprodukt direkt mit einem sechsfachen Überschuss an TBSCl umzusetzen und das doppelt TBS-geschützte Cyclopenten **44** in 77% zu erhalten. Das Epoxid wurde mittels *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) mit einer sehr guten Ausbeute von 88% eingeführt. Die Stereochemie von Cyclopentan **45** konnte über 2D-NMR bestätigt werden (vgl. Abbildung 33).

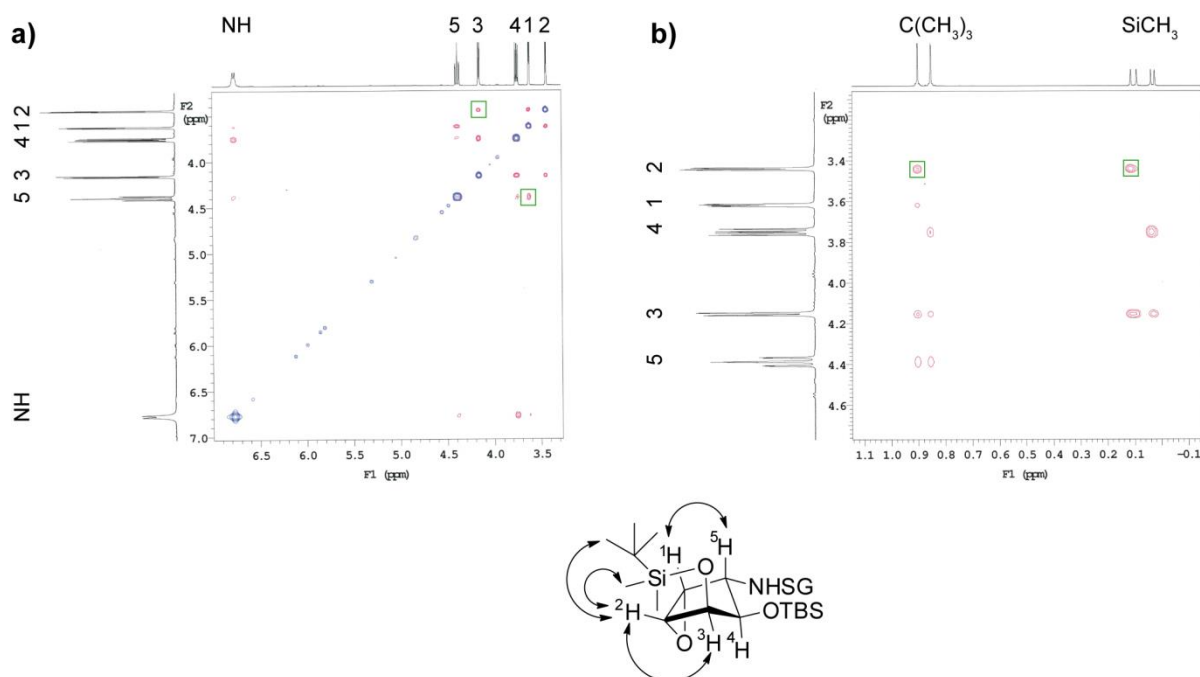
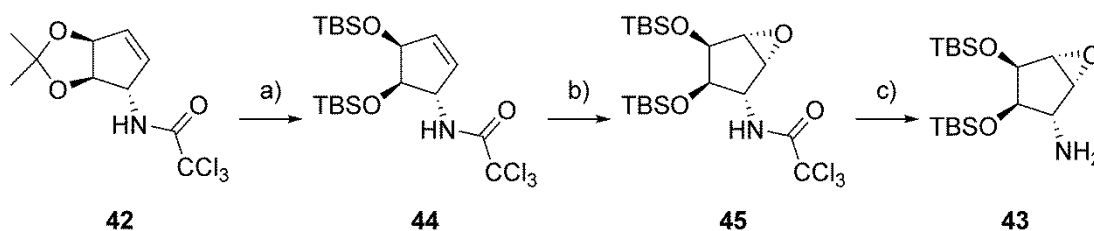


Abbildung 33: 2D-NMR (NOESY) von Cyclopentan **45**. a) Die Kopplung von H2 zu H3 ist hier verdeutlicht. b) Die Kopplung von H2 zu einer der TBS-Schutzgruppen ist hier herausgehoben.

Die basische Entschützung zum freien Amin **43** lieferte lediglich in Ethanol eine sehr gute Ausbeute von 87%. Dagegen konnten in Methanol nur 5% des gewünschten Produkts erzielt werden.¹¹⁵

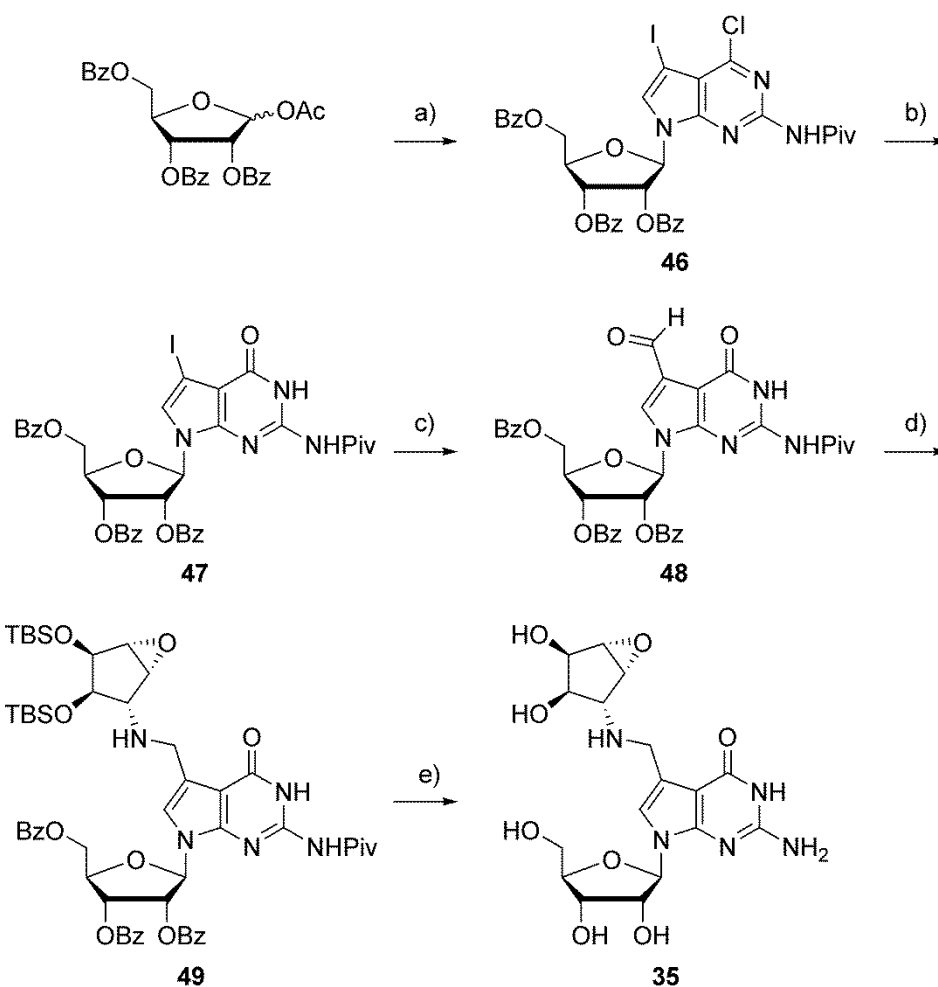


Schema 12: Synthese zu Epoxyverbindung **43**. a) i) AcOH (70%), 40 °C, 20 h; ii) TBSCl, Pyridin, 40 °C, 20 h, 77%; b) *m*CPBA, DCM, 0 – 50 °C, 5 h, 88%; c) EtOH, NaOH (2 M), rt, 13 h, 87%.

Die Einführung des Epoxids muss am geschützten Amin stattfinden, da sonst das Amin zur Reaktion gebracht wird. Das freie Amin wurde einerseits von *m*CPBA zur Nitroverbindung (57%) oxidiert, andererseits bildete sich mit Oxon® in Aceton das entsprechende Imin mit 85%.¹⁴⁹

6.2.1.3 Synthese und Analytik von Epoxyqueuosin

Iodbase **41** wurde unter *Vorbrüggen*-Bedingungen mit 1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose versetzt. Diese Glykosylierung ergab Nukleosid **46** in 52% Ausbeute. Darauf wurde mit DABCO und CsOAc dechloriert, um 7-Desazaguanosin **47** zu erhalten. Die darauf folgende *Stille*-ähnliche Formylierung konnte mit Hilfe eines Autoklavens verbessert werden. Die Reaktion wurde unter 3 bar CO-Druck durchgeführt. Somit wurden 91% Ausbeute statt der bislang möglichen 73% erreicht. Aldehyd **48** konnte in einer reduktiven Aminierung mit Epoxid **43** verknüpft werden. Das zunächst gebildete Imin wurde direkt mit NaBH₄ zu dem vollgeschützten oQ **49** in 73% reduziert. Wären die Alkohole am Cyclopentanring ungeschützt, könnte in Kombination mit Base eine *Payne*-Umlagerung stattfinden. Daher mussten zunächst die baselabilen Schutzgruppen entfernt werden. Dies konnte mit methanolischer Natronlauge (0.5 M) verwirklicht werden. Die darauf folgende Entschützung der TBS-Gruppen wurde ohne weitere Aufarbeitung mit HF·NEt₃ durchgeführt und ergab Epoxyqueuosin oQ **35** in 66%.¹¹⁵ Ausgehend von Bromacetaldehyd und D(+)-Mannose ergibt sich eine Gesamtausbeute von 0.9% über 22 Stufen.



Schema 13: Synthese zu oQ **35**. a) **41**, TMSOTf, BSA, MeCN, 50 °C, 2 h, 52%; b) CsOAc, DABCO, NEt₃, DMF, rt, 48 h, 57%; c) Pd₂(dba)₃, CO, PPh₃, Bu₃SnH, Toluol, 55 °C, 3 bar, 1 h, 91%; d) i) **43**, Benzol, 50 °C, 4 h; ii) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 1 h, 73%; e) i) NaOH in MeOH (0.5 M), rt, 24 h; ii) HF·NEt₃, DCM, rt, 2 h, 66%.

Die Struktur des Epoxyqueuosins wurde mittels NMR bestätigt. Um sicher zu stellen dass es sich um das natürliche Stereoisomer handelt, wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) unter minimierten Bedingungen in einem 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) Medium kultiviert, welches kein Vitamin B12 enthält.¹⁰⁴ Es ist bekannt, dass unter diesen Bedingungen, also unter Vitamin B12 Mangel, keine Biosynthese von oQ zu Q durchgeführt werden kann.¹⁵⁰ Die tRNA dieses *E. coli* Stammes wurde isoliert und enzymatisch verdaut. Das Nukleosidgemisch wurde mittels HPLC-MS analysiert. Da die Konzentration der Modifikation Epoxyqueuosin zu gering ist, um direkt vom UV-Detektor detektiert zu werden, wurden die Proben an der LTQ Orbitrap gemessen. Im Massensfilter $m/z=426.1619 \pm 0.004$ für $[M+H]^+$ war genau ein Signal zu sehen, welches der natürlichen oQ Modifikation zugeschrieben werden konnte. Das synthetisch dargestellte Molekül wurde ebenfalls unter diesen Bedingungen gemessen und anschließend zu einem Verdau der *E. coli* RNA zugespielt. Wie erwartet war auch hier lediglich ein Signal zu sehen (Abbildung 34), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um die natürliche Modifikation handelt.¹¹⁵

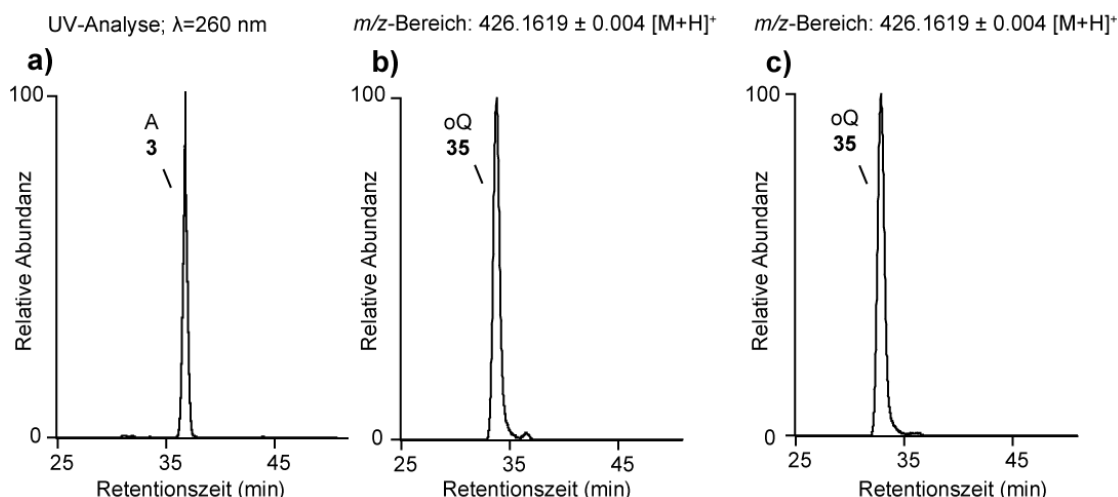
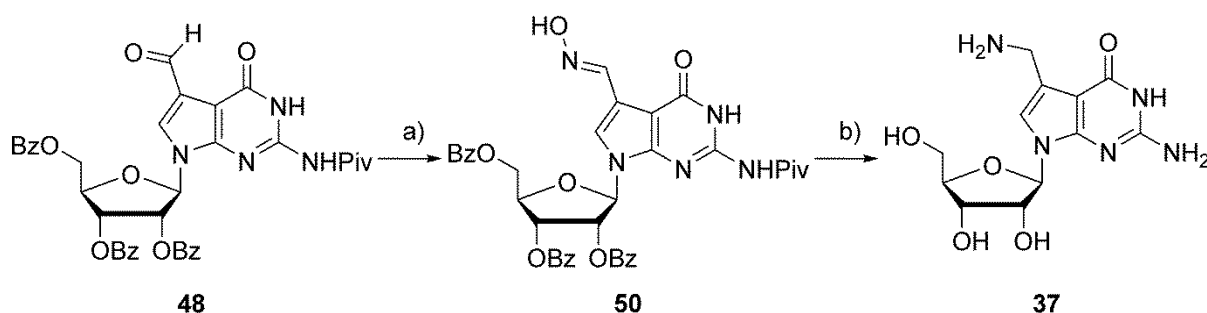


Abbildung 34: Koinjektionsexperiment. a) Ein Ausschnitt der UV-Spur der Verdauprobe – zu sehen ist hier das Signal von Adenosin **3**. Die Konzentration von oQ **35** ist zu gering um ein UV-Signal zu detektieren ($\lambda=260$ nm). b) Die Massenspur der Verdauprobe $m/z=426.1619 \pm 0.004$ der protonierten Form von Epoxyqueuosin $[M+H]^+$. c) Die Massenspur der Verdauprobe und des konjizierten synthetisch dargestellten oQ **35** $m/z=426.1619 \pm 0.004$ der protonierten Form von Epoxyqueuosin $[M+H]^+$.

6.2.2 Synthese von der Hypermodifikation preQ1 (37)

Aldehyd **48** eröffnet nicht nur Wege zu noch nicht dargestellten 7-Desazamodifikationen sondern auch eine verbesserte Synthesemöglichkeit zu bereits Synthetisierten wie zum Beispiel preQ1 **37**. Ebenso wie oQ **35** ist preQ1 **37** ein Biosynthesevorläufer in der Biosynthese von Queuosin **33** in Prokaryoten (siehe Kapitel 5.4). Bislang waren zwei Synthesewege zu preQ1 bekannt. Die Gruppe um Goto entwickelte bereits 1986 eine Synthese mit 17 Stufen und einer Gesamtausbeute von 2.6%.¹⁵¹ Cheng *et al.* publizierten 1997 einen kürzeren Weg mit nur zehn Stufen. Jedoch wurde hier lediglich eine Gesamtausbeute von 0.4% erreicht.¹⁵²



Schema 14: Synthese zu preQ1 **37**. a) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, NaHCO_3 , EtOH , -20°C , 12 h, 65%; b) i) $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MeOH , NaBH_4 , 0°C , 1 h; ii) NaOMe (0.5 M), rt, 12 h, 42%.

Die Reaktion von Aldehyd **48** mit Hydroxylamin ergab Oxim **50** mit einer Ausbeute von 65%. Die darauf folgende Reduktion des Oxims zum Amin konnte mit Nickelchlorid^{153,154} und Natriumborhydrid durchgeführt werden. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung mit Natriummethanolat entschützt und ergab preQ1. So ergibt sich ausgehend von Bromacetaldehyd eine Gesamtausbeute von 2.1% in neun Stufen.¹⁴⁵

Der Versuch mit Ammoniak in Dioxan zu aminieren konnte nicht realisiert werden. Ebenso konnte eine Reduktion ohne Nickelchlorid nicht beobachtet werden.

6.2.3 Synthesestudien zur Hypermodifikation Glutamyl-Queuosin gluQ (36)

Es ist noch immer nicht bekannt an welchen der Alkohole Glutamyl-Queuosin **36** mit der Glutaminsäure verestert ist. Es wurde postuliert, dass die Zucker-Derivate Galactosyl-Queuosin (glaQ) und Mannosyl-Queuosin (manQ) (vgl. Abbildung 36) an dem nicht-allylischen Alkohol gebunden ist.¹³² Daher wurde im Folgenden zunächst überprüft, ob die Aminosäure an dem nicht-allylischen Alkohol gebunden ist. Bei der Syntheseplanung (vgl. Abbildung 35) muss darauf geachtet werden, dass der Ester zwischen Queuosin und Aminosäure basenlabil ist. Es dürfen daher keine Schutzgruppen eingesetzt werden die mit einer Base entfernt werden.

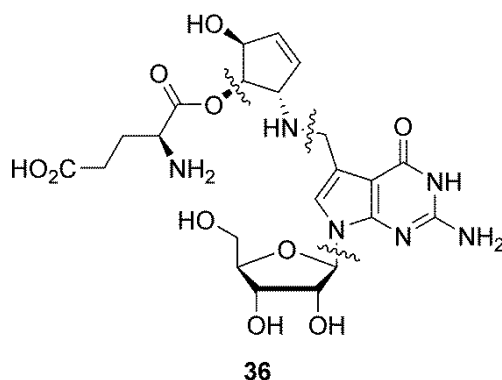
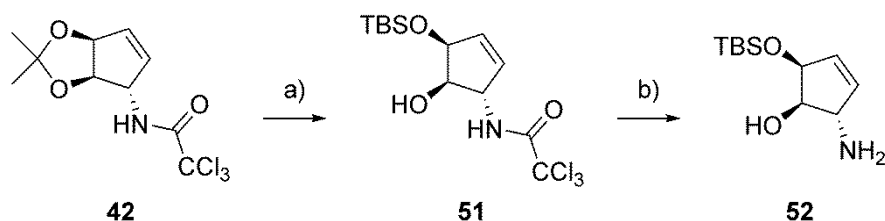


Abbildung 35: Retrosynthetische Schnitte in vier Grundbausteine bei der Syntheseplanung zu gluQ **36**.

6.2.3.1 Synthese von Cyclopentenring **51**

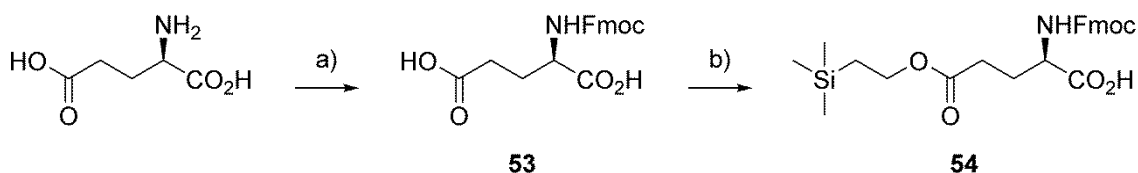
Die Entschützung der Acetonid-Schutzgruppe von Cyclopenten **42** wurde, wie in Kapitel 6.2.1.2, ebenfalls in Essigsäure realisiert. Statt eines sechsfachen Überschusses an TBSCl wurden hier nur 1.2 Äq eingesetzt. Somit konnte in 64% das einfach TBS-geschützte Cyclopenten **51** erhalten werden. In 21% entstand das am nicht-allylischen Alkohol einfach-TBS-geschützte Cyclopenten und in 9% das doppeltgeschützte. Nach der basischen Entschützung des Amins konnte Cyclopenten **52** isoliert werden.



Schema 15: Synthese zu Cyclopenten **52**. a) i) AcOH (70%), 40 °C, 20 h; ii) TBSCl, Pyridin, rt, 20 h, 64%; b) MeOH, NaOH (2 M), rt, 13 h, 50%.

6.2.3.2 Synthese von Aminosäure **54**

Zur Synthese des Aminosäurenbausteines wurde ausgehend von L-Glutaminsäure unter *Schotten-Baumann*-Bedingungen mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) und Natriumcarbonat die *N*^α-geschützte Aminosäure **53** hergestellt. Um das unter den basischen Bedingungen zunächst entstandene Dianion zu isolieren musste bei der Extraktion HCL (2 M) zugegeben werden. Nach Umkristallisation aus einem Ethylacetat/Isohexan-Gemisch (1:1) konnte die vollständig protonierte Fmoc-geschützte Aminosäure **53** mit einer sehr guten Ausbeute von 92% in Form von farblosen Kristallen erhalten werden. Die Veresterung der δ -Carboxygruppe konnte mit Trimethylsilylethanol realisiert werden. Mit nur einem Äquivalent des Silylreagenz konnte eine leichte Präferenz zur Reaktion der sterisch weniger gehinderten δ -Carboxygruppe beobachtet werden. So wurde Aminosäure **54** synthetisch dargestellt.

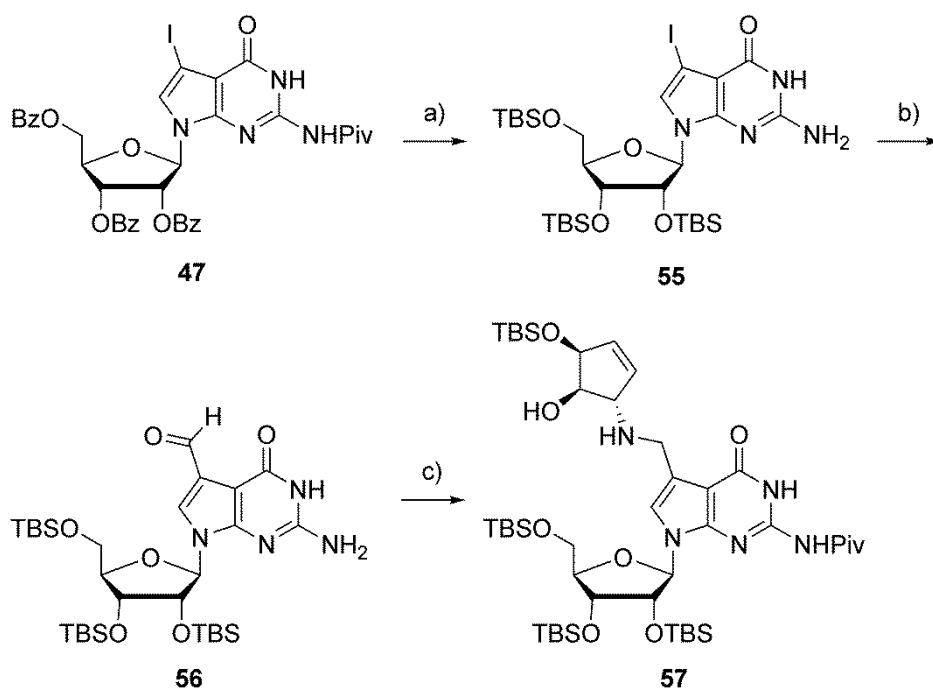


Schema 16: Synthese zur geschützten Aminosäure **54**. a) Na_2CO_3 , MeCN/ H_2O (1:1), Fmoc-OSu, rt, 0.5 h, 92%; b) DMAP, TMS-ethanol, DCC, MeCN, 0 °C, 23 h, 39%.

6.2.3.3 Synthesestudien zu gluQ (**36**)

Die Benzoyl- und Pivaloylschutzgruppen sind basenlabil. Daher eignen sich diese nicht für die Synthesestrategie zum Glutamyl-Queuosin **36**. Da die Aminosäure über eine Esterbindung mit dem 7-Desazaguanosin verbunden ist kann auch diese Bindung bei der Entschützung gebrochen werden. Folglich wurden zunächst die basenlabilen Schutzgruppen von 7-Desazaguanosin **47** in methanolischem Ammoniak entfernt. Ohne weitere Aufarbeitung konnten die Alkohole in einer Folgereaktion zu Nukleosid **55** mit einer Ausbeute von 60% TBS-geschützt werden. Die *Stille*-ähnliche CO-Insertion unter Druck konnte mit einer guten Ausbeute von 57% durchgeführt werden und ergab Aldehyd **56**. Die reduktive Aminierung mit Cyclopenten **52** ergab Nukleosid **57** in 48%.

Die bisherigen Versuche der Veresterung von **57** mit **54** scheiterten allerdings bislang alle.

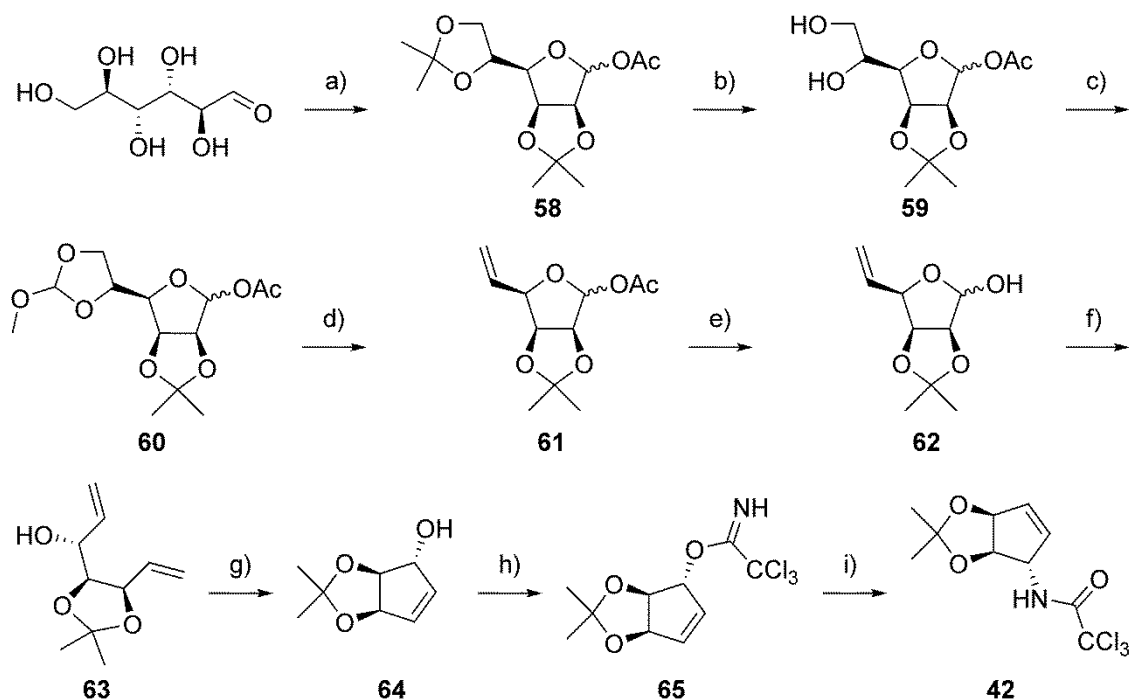


Schema 17: Synthesestudien zu gluQ **36**. a) i) NH_3 (1 N), 40 °C, 24 h; ii) TBSOCl, Imidazol, DMF, 40 °C, 24 h, 60%; b) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, CO, PPh_3 , Bu_3SnH , Toluol, 55 °C, 3 bar, 1 h, 57%; c) i) **52**, Benzol, 50 °C, 4 h; ii) NaBH_4 , MeOH, 0 °C, 1 h, 48%.

6.2.4 Synthese von Cyclopenten **42**

Aufgrund der großen von Cyclopenten **42** benötigten Mengen wurde die Synthese von *Ova* gewählt.¹⁵⁵ Ausgehend von D(+)-Mannose konnte Cyclopenten **42** über zehn Stufen mit einer Gesamtausbeute von 41% synthetisch dargestellt werden. Zunächst wird hierfür die Mannose Acetonid- und der bleibende freie Alkohol Acetyl-geschützt, um Ribose **58** zu erhalten. In 64%iger Essigsäure wurde die endständige Acetonid-Schutzgruppe selektiv abgespalten und die somit entstandene Ribose **59** konnte mit Trimethylformiat zum Ameisensäure-Orthoester **60** überführt werden. In Essigsäureanhydrid wurde Kohlendioxid eliminiert und somit die in Zucker **61** vorhandene Doppelbindung eingeführt. Zucker **62** wurde durch Entfernen der Acetylschutzgruppe mit Kalium-*tert*-butanolat synthetisiert und das Reaktionsgemisch das erste Mal mittels Destillation aufgereinigt. Es ergibt sich folglich über sechs Stufen eine Gesamtausbeute von 69%.

Die darauf folgende *Wittig*-Reaktion ergab Alkohol **63** mit 82%. Mit Hilfe des *Grubbs I* Katalysators konnte der Ringschluss zu Cyclopenten **64** verwirklicht werden. Der freie Alkohol wurde in einer sehr guten Ausbeute von 92% mit Trichloracetonitril geschützt, um das entstandene Cyclopenten **65** zu erhalten. Mit einer *Overmann*-Umlagerung wurde Cyclopenten **42** mit einer exzellenten Ausbeute von 93% isoliert.



Schema 18: Synthese zu Cyclopenten **42**. a) i) DMP, *p*-TsOH, 80 °C, 4 h; ii) Ac₂O, Pyridin, rt, 18 h; b) AcOH (64%), 55 °C, 3.5 h; c) CH(OMe)₃, 100 °C, 0.5 h; d) Ac₂O, 130 °C, 5 h; e) KO^tBu, MeOH, 0 – rt, 5 min, 69% über sechs Stufen; f) NaH, DMSO, PMPPh₃Br, THF, 0 – 65 °C, 6 h, 82%; g) *Grubbs I*, DCM, rt, 24 h, 85%; h) Cl₃CCN, DBU, DCM, 0 – rt, 0.2 h, 93%; i) *o*-Xylol, 150 °C, 5 h, 93%.

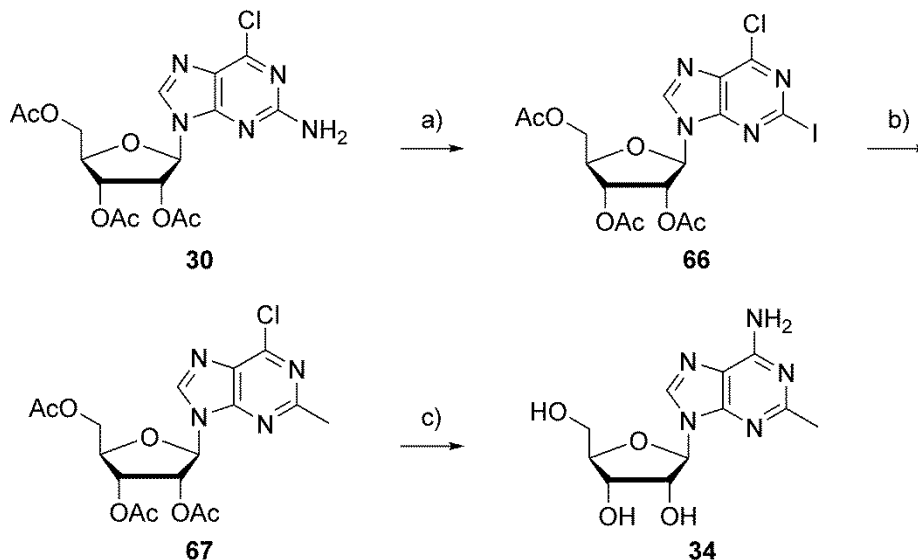
Insgesamt konnte somit Cyclopenten **42** über neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 48% im Grammmaßstab synthetisch dargestellt werden.

6.3 Synthese von 2-Methyladenosin m²A (**34**)

Im Rahmen dieser Dissertation wurden in Kooperationen mit der Gruppe um *Bourquin* die Synthese von 2-Methyladenosin **34** m²A durchgeführt, um damit die Erkennung von m²A durch murine Immunzellen zu untersuchen.¹⁵⁶ Die Synthese basierte auf der von *Dr. Brückl*¹⁰⁴ ausgearbeiteten Synthese.

Das acetylgeschützte, an Position 6 chlorierte Guanosin **30** (vgl. Kapitel 4.6.5) wurde mit Amylnitrit, CuI und Diiodmethan umgesetzt, um die 2-Aminofunktion über Diazotierung mit Iod zu substituieren. Das somit erhaltene Iodnukleosid **66** wurde über eine *Negishi*-Kupplung an Position 2 mit einer Methylgruppe substituiert, um Nukleosid **67** zu erhalten. In einem

Schritt wurden die Hydroxygruppen entschützt und das Chlor an Position 6 in die Aminogruppe umgewandelt. Hierfür wurde Nukleosid **67** in Ammoniak einkondensiert und über HPLC gereinigt, um m²A **34** zu erhalten. Somit konnte m²A ausgehend von Guanosin über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 26% synthetisch dargestellt werden.

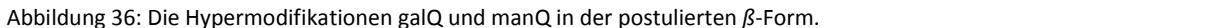


Schema 19: Synthese zu m²A **34** ausgehend von Nukleosid **30**. a) I₂, CuI, CH₂I₂, Amylnitrit, THF, 70 °C, 2 h, 57%; b) ZnCl₂, MeMgCl, Pd(PPh₃)₄, THF, 0 °C – rt, 4 h, 81%; c) NH₃, rt, 48 h, 69%.

Mit Hilfe des synthetisch dargestellten m²A konnte die Gruppe um *Bourquin* erstmals zahlreiche Hinweise für eine partielle Rolle des Adenosinrezeptors A2A bei der Erkennung von m²A sowie der darauffolgenden Interleukin-1 *beta* Reifung und Sekretion erhalten.¹⁵⁶

6.4 Messungen zu den Hypermodifikationen galQ und manQ

Die in Abbildung 36 dargestellten Modifikationen Galactosyl-Queuosin (galQ) und Mannosyl-Queuosin (manQ) wurden im Rahmen einer Doktorarbeit von *Dr. Thumbs*¹⁵⁷ synthetisiert. Aus der Literatur geht hervor, dass die entsprechenden Zucker an der nicht-allylischen Hydroxygruppe in β -Form gebunden sind.¹³² Bislang wurde die Struktur der Moleküle jedoch noch nicht bestätigt.



In Abbildung 37a ist zu sehen, dass die natürliche Probe bei dem Massenfilter $m/z=572.2198 \pm 0.004$ für $[M+H]^+$ zwei Signale zeigt. Mit den synthetisch dargestellten Molekülen konnten nun Koinjektions-Experimente durchgeführt werden. Bei der Koinjektion von galQ und β -manQ ist in Abbildung 37c ein deutlicher Anstieg des Signals bei 27.12 min zu sehen. Dieses Signal ist aufgrund von Koinjektion-Experimenten, in denen lediglich galQ zugegeben wurde, dem synthetisch dargestellten galQ zuzuschreiben. Wie in der Literatur beschrieben¹³² handelt es sich im Fall von galQ um das kleinere der beiden Signale. Mit Hilfe der NMR-Daten von *Dr. Thumbs* kann somit die Stereochemie von galQ bestätigt werden.

57

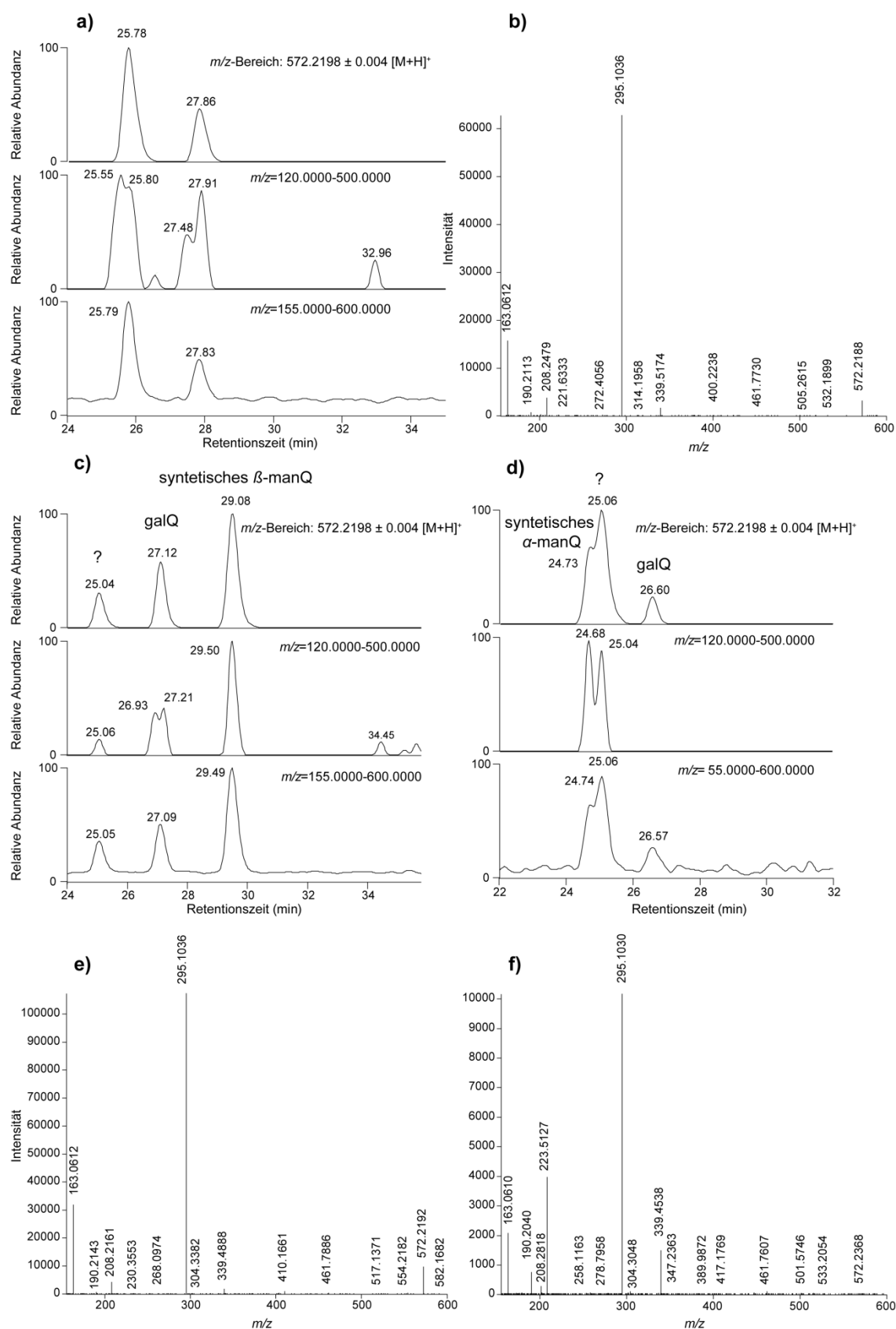


Abbildung 37: LCMS-Spektren mit Fragmentierung in der Ionenfalle. **a)** LCMS-Spektrum vom enzymatischen Verdau. **b)** Fragmentierungs-Spektrum in der Ionenfalle von der natürlichen Probe (Signale bei 25.55). **c)** LCMS-Spektrum vom enzymatischen Verdau mit zugespiem synthetisch dargestellten galQ und β -manQ. **d)** LCMS-Spektrum vom enzymatischen Verdau mit zugespiem synthetisch dargestellten galQ und α -manQ. **e)** Fragmentierungs-Spektrum in der Ionenfalle vom synthetisch dargestellten β -manQ (Signale bei 29.50). **f)** Fragmentierungs-Spektrum in der Ionenfalle vom synthetisch dargestellten α -manQ (Signale bei 24.68).

Abschließend könnte noch das Nukleosid synthetisch dargestellt werden, welches über die allylische Hydroxygruppe (Abbildung 38) an Mannose verknüpft ist. Denn das NMR der Originalliteratur deutet mit einer Kopplungskonstante $J < 1$ Hz auf eine β -Verknüpfung hin.

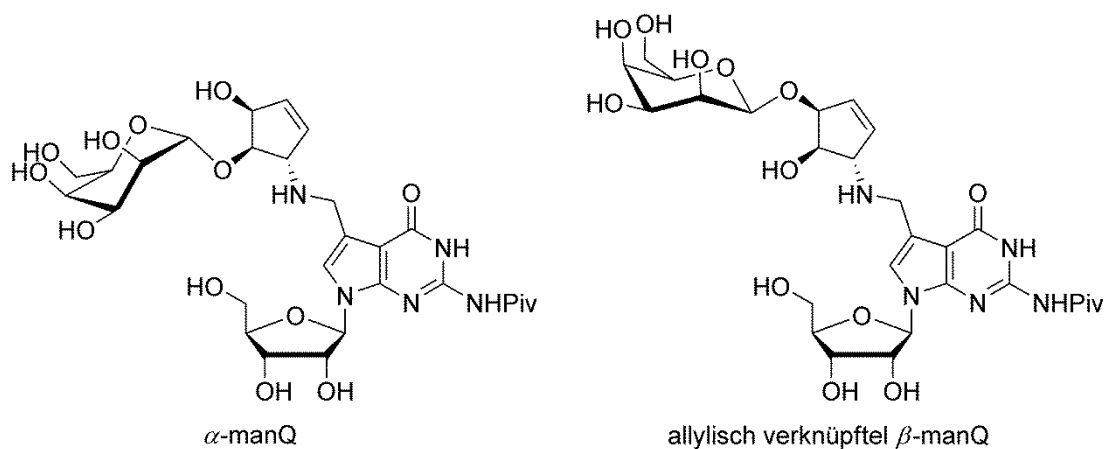


Abbildung 38: Das synthetisch dargestellte jedoch ausgeschlossene α -manQ und die Alternative, bei der die β -Mannose über die allylische Hydroxygruppe verknüpft ist.

Mit Hilfe natürlicher Proben und der massenspektroskopischen Untersuchungen konnte die Struktur von galQ bestätigt und die postulierte Struktur von manQ¹³² widerlegt werden.

6.5 Ausblick

Das nun synthetisch zugängliche Epoxyqueuosin könnte über das entsprechende Phosphoramidit in einen RNA-Strang eingebaut werden. Somit wären Kristallisations-Experimente möglich, um eine Kristallstruktur der Eisen-Schwefel-Reduktase und dessen Substrat im Komplex zu erhalten. Hierfür wäre es denkbar, ein nicht aktives Derivat des Coenzym Vitamin B12 zu verwenden, um die Reaktion zu Queuosin zu hemmen. Ferner könnte ein Isotopenmarkierter Standard in der Quantifizierung eingesetzt werden.

Ferner könnte die Synthese zu dem hypermodifizierten Glutamyl-Queuosin über zahlreiche Optimierungen¹⁶⁰⁻¹⁶³ der Veresterung ablaufen.

Ferner könnten für die Aufklärung der Struktur von manQ, neben der Synthese der alternativen Strukturen, die enzymatischen Hydrolysate der tRNA mit sauren Puffern inkubiert werden. Somit würde eine glykosidische Spaltung erzeugt werden und es könnte möglich sein, eine Aussage über die Verknüpfung des Zuckers zu erhalten. Eine Verknüpfung über den allylischen Alkohol könnte labiler sein, als die Verknüpfung über den nicht-allylischen Alkohol.

7 Experimenteller Teil

7.1 Material und Methoden

Allgemein

Alle Reaktionen unter Wasser- und Sauerstoffausschluss wurden in ausgeheizten (Ofen oder Heißluftpistole) Glasgeräten unter Stickstoff- oder Argonatmosphäre durchgeführt. Wasserfreie Lösemittel oder Reagenzien wurden mittels einer Kanüle oder Spritze in das Reaktionsgefäß überführt. Das Entfernen der Lösemittel *in vacuo* erfolgte am Membranpumpenvakuum mit den Rotationsverdampfern *Laborota 4000 efficient* bzw. *Hei-VAP Advantage* der Firma *Heidolph* oder *RV 05-ST* der Firma *Janke und Kunkel*. Alle Reaktionsprodukte wurden am Hochvakuum (10^{-2} – 10^{-3} mbar) getrocknet. Wässrige Lösungen von HPLC-aufgereinigten Produkten wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und mittel *Alpha 2-4 LDplus Lyophilisator* der Firma *Christ* am Ölpumpenvakuum getrocknet. Kleinere Mengen an wässrigen oder diversen organischen Lösungen wurden mit einer *SpeedVac Plus SC110A* bzw. *SpeedVacSPD111V* der Firma *Savant* entfernt. Molekularsieb (3Å) wurde vor Verwendung für mehrere Tage bei 100 °C oder über Nacht im Sandbad bei 300 °C getrocknet.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden Aluminium-Fertigplatten *Kieselgel 60 F254* (Schichtdicke 0.25 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Licht (λ = 254 nm bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit Tauchreagenzien wie Anisaldehyd-Lösung (2.2 g Anisaldehyd, 2 mL konz. H_2SO_4 und 100 mL Eisessig), Ninhydrin-Lösung (1.5 g Ninhydrin, 100 mL, *n*-Butanol, 3 mL Eisessig) oder Cer-Lösung (2.5 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5 g $\text{H}_3\text{Mo}_{12}\text{O}_{40}\text{P}$, 6 mL H_2SO_4 (konz.), 94 mL H_2O). Die Platten wurden anschließend mit einer Heißluftpistole erhitzt.

Enzymatischer Verdau

Die RNA-Probe wurde für 3 min auf 99 °C bei 900 rpm inhibiert und im Anschluss für 5 min auf 0 °C abgekühlt. Es wurden je 12 µg RNA mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 µL gebracht und mit 10 µL ZnSO_4 (1 mM) und 2 µL Nuklease S1 (4.6 µL *Stock* auf 20.4 µL ddH₂O – *Aspergillus oryzae*, *Sigma Aldrich*) versetzt. Die Lösung wurde für 3 h bei 37 °C mit 0 rpm inkubiert. Darauf wurden 12 µL EDTA-Na_2 (1 mM), 2 µL *Snake Venom Stock* (*Crotalus*

adamanteus venom, USB Corporation) und 2 μL *Antarctic Phosphatase Stock* (New England Biolabs) zugegeben und für 3 h bei 37 °C und 0 rpm inkubiert. Die Lösung wurde für 15 min bei 13400 rpm zentrifugiert und 105 μL vom Überstand abgenommen. Diese 105 μL wurde für die Koinjektions-Experimente benutzt.

Lösemittel und Chemikalien

Lösemittel und Chemikalien wurden - soweit nicht anders angegeben - von den Firmen *Acros*, *Aldrich*, *Fluka*, *Merck* und *Sigma* in den kommerziell erhältlichen Qualitäten puriss., p. a. oder purum eingesetzt. Trockene Lösemittel wurden von den Firmen *Acros* und *Fluka* mit einem Wassergehalt < 50 ppm bezogen. Für Anwendungen an der HPLC und MS-Studien wurde Wasser durch eine *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* deionisiert. Lösemittel für Extraktionen und säulenchromatographische Aufreinigungen waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung destilliert. Für HPLC-basierende Auftrennungen wurden Lösemittel der HPLC-Qualität *gradient grade* von den Firmen *Fisher*, *Sigma-Aldrich* und *VWR* bezogen.

LC-ESI-MS/MS Methode

Die LC-ESI-MS/MS Analyse wurde an einem *Agilent* 1290 UHPLC System und einem *Agilent* 6490 Triple-Quadrupole Massenspektrometer gemessen. Die Nukleoside wurden im *selected reaction monitoring* Modus (SRM) für positive Ionen gemessen. Generel waren die Quelle-abhängigen Parameter wie folgt: *Gas Temp* 50 °C, *Gas Flow* 15 L/min (N₂), *Nebulizer* 30 psi, *Sheath Gas Heater* 275 °C, *Sheath Gas Flow* 11 L/min (N₂), *Capillary Voltage* 2500 V und *Nozzle Voltage* 500 V. Für die Analyse wurde eine Zorbax RRHD SB-C8 Säule von *Agilent* (1.8 μm , 2.1 mm \times 150 mm) benutzt. Die Verbindungen wurden über Puffer E/Puffer F-Gradienten separiert: 0 \rightarrow 5 min; 0 \rightarrow 3.5% Puffer F; 5 \rightarrow 6.9 min; 3.5 \rightarrow 5% Puffer F; 6.9 \rightarrow 7.2 min; 5 \rightarrow 80% Puffer F; 7.2 \rightarrow 10 min; 80% Puffer F; 10 \rightarrow 10.3 min; 80 \rightarrow 0% Puffer F; 10.3 \rightarrow 12 min; 0% Puffer F. Die Säulentemperatur wurde auf 30 °C eingestellt. Die Flussrate war 0.4 mL min⁻¹ und das Injektionsvolumen 10 μL . Der Vorlauf bis 1.5 min und der Nachlauf ab 9 min (insgesamt 12 min) wurden zum Abfall umgeleitet. Der Autosampler wurde auf 10 °C gekühlt. Verbindungsabhängige Parameter: Die Fragmentierung wurde bei 300 V durchgeführt. Delta EMV war 300, CE [V] (*collision energy*): 5; CAV (*collision cell accelerator voltage*): 5; EMV: *electron multiplier voltage*; MS1 Resolution: enhanced; MS2 Resolution: enhanced; Dwell time [ms]: 240; Adenosinmonophosphat: Mutterion – $m/z=348.0704$ [M+H]⁺; Produktion: Adenin – $m/z=136.0618$ [M+H]⁺; Adenosin: Mutterion – $m/z=268.1040$ [M+H]⁺; Produktion: Adenin – $m/z=136.0618$ [M+H]⁺.

Hochauflösende Massenspektroskopie (HRMS)

Hochauflösende Massenspektren wurden von der Abteilung Massenspektroskopie des Departments Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München aufgenommen. Für ESI-Massenspektren wurde ein *Thermo Finnigan LTQ-FT* Spektrometer mit ESI-Quelle verwendet. EI-Massenspektren wurden mit einem *Varian MAT 95* aufgenommen.

HPL-Chromatographie

Die analytische als auch präparative *reversed phase* (rp) Chromatographie wurde auf den Anlagen *L-7400* UV- und *L-7420* UV/VIS-Detektor, *L-7100*- und *L-7150* Pumpe, *D-7200* Autosampler, *L-7000*, Interfacemodul und *L-7612* bzw. *ERC-3415* (Firma *Merck-Hitachi*) oder *2487 Dual λ -Absorbance Detector*, *1525 Binary HPLC Pump*, *2695 Separations Module* und *2996*, bzw. *996 Photodiode Array Detector* (Firma *Waters*) durchgeführt. Bei den Entgasern handelte es sich um die jeweiligen Modelle der Hersteller. Die präparativen Trennungen wurden auf folgenden rp Säulen durchgeführt: *CC 250/10 Nucleosil 100-7 C18* oder *CC 250/10 Nucleodur 100-7 C18* (Firma *Macherey-Nagel*). Für die analytischen HPLC Trennungen wurden die Säulen *CC 250/4 Nucleosil 4 120-3 C18* und *CC 250/4 Nucleodur 4 120-3 C18* (Firma *Macherey-Nagel*) eingesetzt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Trennung von Nukleosiden folgende Puffersysteme verwendet: Puffer A (2 mM HCOONH_4 in H_2O , pH 5.5) mit Puffer B (2 mM HCOONH_4 in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80, pH 5.5); Puffer C (0.1 M Triethylamin/Essigsäure in H_2O) mit Puffer D (0.1 M Triethylamin/Essigsäure in 20% H_2O und 80% MeCN); Puffer E (0.0085% Ameisensäure in H_2O) mit Puffer F (0.0085% Ameisensäure in MeCN). Die analytische HPLC Flussrate was 0.5 mL/min und die präparative HPLC Flussrate war entweder 5 mL/min oder 15 mL/min. Messungen an der Hochauflösenden Masse erfolgten mit Puffer A und B (Orbitrap), beziehungsweise mit Puffer E und F (*TripleQuad*).

HPLC-ESI-MS

Die Proben (1 – 100 μL Injektionsvolumen) wurden per HPLC-ESI-MS auf einer *Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL* massenspektrometrisch analysiert und über einem *Dionex Ultimate 3000* HPLC System chromatographisch aufgetrennt. Als stationäre Phase wurde eine *Uptisphere 120-3HDO* Säule von *Interchim* und eine *EC 125/2 Nucleosil 120-3-C8 Macherey-Nagel* verwendet, wobei die Säulentemperatur konstant auf 30°C gehalten wurde. Der Fluß der mobilen Phase betrug 0.15 mL/min, und diese wurde direkt in die Ionenquelle injiziert, ohne vorheriges Splitting. Die Proben wurden im positiven Ionisierungsmodus über den vollen Messbereich von m/z 120-1000 mit einer Auflösung von 30.000 gemessen. Die Parameter des Massenspektrometers wurden mit einer frisch angesetzten Adenosinlösung (5 mM) in Puffer C kalibriert. Folgende Parameter wurden eingestellt: *sheath gas flow Rate*,

16 arb; *auxiliary gas flow* Rate, 11 arb; *sweep gas flow* Rate, 6. Experimenteller Teil 97 4 arb; *spray voltage* 5.0 kV; Kapillartemperatur, 200°C; Kapillarspannung 12 V, *tube lens* 60 V.

Infrarot-Spektroskopie

Infrarotspektren (IR) wurden an einem *Perkin-Elmer 281* Spektrometer mit Diamant-ATR-Einheit verwendet und die Substanzen als Reinsubstanzen gemessen. Die Charakterisierung der Banden erfolgt nach folgenden Abkürzungen: *vs* (*very strong*), *s* (*strong*), *m* (*medium*), *w* (*weak*), *br* (*broad*). Die Absorption wurde in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Der Aufnahmebereich erstreckte sich von 600 - 4000 cm^{-1} .

Kernresonanzspektroskopie

^1H -Kernresonanzspektren (^1H -NMR) mit einer Auflösung von 200 MHz wurden bei RT mit den Geräten *Varian Oxford 200* und *Varian Mercury 200 VX* aufgenommen. ^1H - bzw. ^{13}C -Kernresonanzspektren (^1H - bzw. ^{13}C -NMR) höherer Feldstärke wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München erstellt, wobei die Geräte *Bruker AC 300*, *Varian XL 400* sowie *Bruker AMX 600* verwendet wurden. In Klammern wurden die benutzten Messfrequenzen in MHz und das jeweilige Lösemittel vermerkt. Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden in ppm relativ zu dem externen Standard TMS (Tetramethylsilan, $\delta = 0$ ppm) angegeben. In Klammern wurden jeweils die Messfrequenzen in MHz sowie das Lösemittel vermerkt. Die Kopplungskonstanten (J) wurden in Hz angegeben. Signalmultiplizitäten sind als s = Singulett (bzw. brs für breites Singulett), d = Dublett, t = Triplett und m = Multiplett, sowie gegebenenfalls deren Kombinationen gekennzeichnet. Signalzuordnungen wurde anhand von COSY-, HSQC-, HMBC- und NOESY-Spektren bestimmt.

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde nach der *Flash*-Methode mittels N_2 -Überdruck bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße 0.040 - 0.063 mm) verwendet. Die Lösemittelgemische wurden in Volumenanteilen angegeben.

Schmelzpunkt

Zur Schmelzpunktbestimmung wurde eine *Büchi Melting Point B-540* Schmelzpunktapparatur verwendet. Die Schmelzpunkte wurden nicht korrigiert.

7.2 Synthese der Formamido-Edukte

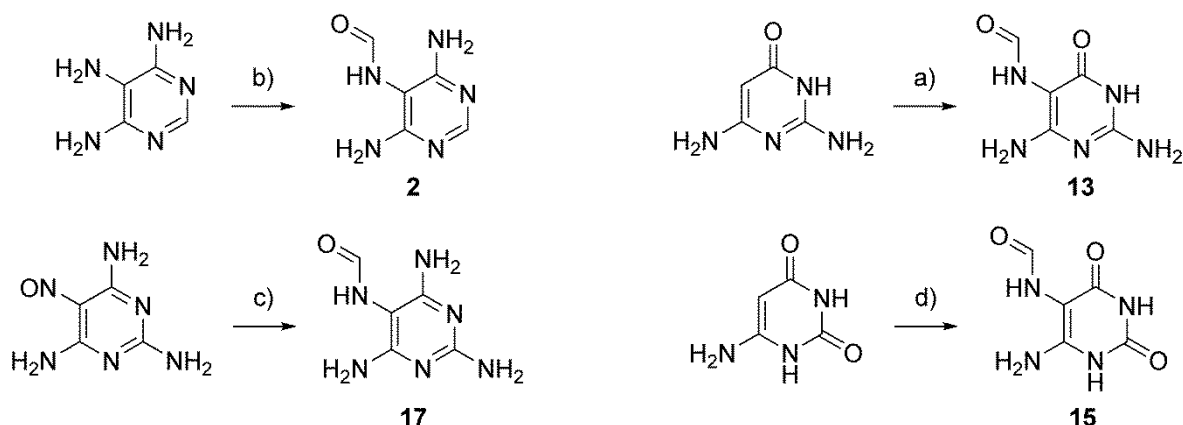
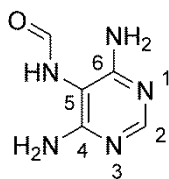


Abbildung 39: Synthese der Formamidopyrimidin-Derivate. a) HCO_2H , HCl , rt, 7 d, 72%; b) NaNO_2 , NH_2CHO , HCO_2H , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 60 – 110 °C, 1.5 h, 73%; c) H_2O , HCO_2H , HCO_2Na , Pd/C , 100 °C, 3 h, 79%; d) NaNO_2 , NH_2CHO , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 60 – 110 °C, 1.5 h, 39%.

7.2.1 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FaPyA, 2)⁸¹



4,5,6-Triaminopyrimidine (310 mg, 2.48 mmol, 1.0 Äq) wurde in Ameisensäure (20 mL) suspendiert. Das LM wurde nach sieben Tagen *in vacuo* eingengt und der Rückstand aus Wasser kristallisiert um FaPyA (273 mg, 72%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{zer} : 280 °C;

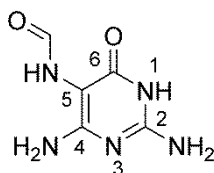
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ =9.13 (s, 1H; NH), 8.13 (s, 1H; HC2), 8.10 (d, $^3J_{\text{CHO,NH}}$ =1.08 Hz, 1H; CHO), 7.44 ppm (s, 4H; NH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ =161.7 (CO), 155.8 (C2), 149.3 (2C; C4, C6), 92.4 ppm (C5);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =3410 (w, NH_2), 3244 (m, NH_2), 3131 (m, NH_2), 1642 (s, NHCHO), 1623 (s, NHCHO) und 1589 (s, NHCHO);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_5\text{O}]^+$ 154.0723, gefunden: 154.0726 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.2.2 2,4-Diamino-6-oxo-5-formamidopyrimidin (FaPyG, 13)⁸²



2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (1 g, 7.93 mmol, 1.0 Äq) und Natriumnitrit (498 mg, 7.22 mmol, 0.9 Äq) wurden in Formamid (6 mL) suspendiert und für 0.5 h auf 60 °C gerührt. Anschließend wurde langsam Ameisensäure (1.26 mL, 33.30 mmol, 4.2 Äq) zugetropft wobei sich die Suspension rosa färbte. Das RG wurde 1 h bei 110 °C gerührt um solange Natriumdisulfit zugegeben bis die Suspension sich gelb färbte. Das RG wurde auf rt abgekühlt, abfiltriert und der Filterkuchen mit kaltem Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wurde aus Wasser (50 mL) umkristallisiert und das farblose Produkt (978 mg, 73%) *in vacuo* getrocknet.

T_{zer}: 305 °C;

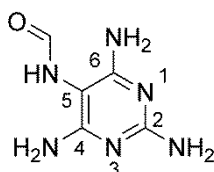
¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ=10.01 (s, 2H; NH), 8.47 (d, ³J_{CHO,NH}=1.64 Hz, 1H; CHO), 7.83 (d, ³J_{NH,CHO}=11.52 Hz, 1H; NH), 7.73 (d, ³J_{CHO,NH}=11.64 Hz, 1H; CHO), 6.21 (s, 2H; NH₂), 6.14 (s, 2H; NH₂), 6.01 (s, 2H; NH₂), 5.78 ppm (s, 2H; NH);

¹³C-NMR (101 MHz, D₆-DMSO): δ=167.3 (CO), 161.9 (CO), 161.0 (2 x C6), 160.4 (C4), 159.9 (C4), 153.8 (C2), 153.7 (C2), 89.1 (C5), 89.0 ppm (C5);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3360 (w, NH₂), 1627 (s, CONH), 1607 (s, NHCHO), 1394 (m, NH) und 707 (m, Ar);

HRMS (ESI⁻): ber. für: [C₅H₆N₅O₂]⁻ 168.0527, gefunden: 168.0527 [M-H]⁻.

7.2.3 2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin (FaPyDN, 16)⁸³



5-Nitroso-2,4,6-triaminopyrimidin (500 mg, 3.24 mmol, 1.0 Äq) wurde in Wasser (1.6 mL) suspendiert, mit Ameisensäure (0.32 mL, 12.98 mmol, 4.0 Äq) und Ammoniumformiat (102 mg, 1.62 mmol, 0.5 Äq) versetzt und bei rt für 5 min gerührt. Anschließend wurde Palladium über Kohlenstoff (10%ig, 8 mg) zugegeben und für 3 h bei 100 °C rühren. Dem RG wurde Wasser (10 mL) zugegeben, heiß filtriert und der Filterkuchen *in vacuo* getrocknet um das Produkt (431 mg, 79%) als orangen Feststoff zu erhalten.

T_{Zer}: 215 °C;

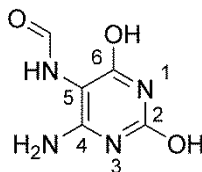
¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ =8.49 (s, 1H; NH), 8.04 (d, $^3J_{\text{CHO,NH}}$ =1.24 Hz, 1H; CHO), 5.62 (s, 4H; C₄NH₂ and C₆NH₂), 5.57 ppm (s, 4H; C₂NH₂);

¹³C-NMR (101 MHz, D₆-DMSO): δ =166.8 (CHO), 161.6 (C₂), 160.2 (C₂; C₃, C₆), 86.8 ppm (C₅);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3009 (m, br, NH₂), 1620 (s, NHCHO) und 1561 (s, NHCHO);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₅H₉N₆O]⁺ 169.0832, gefunden: 169.0831 [M+H]⁺.

7.2.4 4-Amino-2,6-dihydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPyX, 15)



4-Amino-2,6-dihydroxypyrimidin (500 mg, 3.93 mmol, 1.0 Äq) und Natriumnitrit (271 mg, 3.93 mmol, 1.0 Äq) wurde in Formamid (2.5 mL) suspendiert und 0.5 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde langsam Ameisensäure (0.74 mL, 19.67 mmol, 5.0 Äq) zugetropft wobei sich die Suspension rosa färbte. Nach 1 h wurde eine Spatelspitze Natriumdisulfit zugegeben, das RG auf rt abgekühlt und gefiltert. Der Filterkuchen wurden mit Ethanol gewaschen und *in vacuo* getrocknet um FaPyX **15** (261 mg, 39%) als orangefarbenen Feststoff zu erhalten.

T_{Zer}: 381 °C;

¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ =10.43 (s, 1H; NH), 10.37 (s, 1H; NH), 10.06 (s, 2H, 2 x NH), 8.53 (s, 1H; NH), 8.02 (d, $^3J_{\text{CHO,NH}}$ =1.48 Hz, 1H; CHO), 7.94 (d, $^3J_{\text{HCO,NH}}$ =11.56 Hz, 1H; NH), 7.70 (d, $^3J_{\text{CHO,NH}}$ =11.56 Hz, 1H; CHO), 6.31 (s, 2H; NH₂), 6.04 ppm (s, 2H; NH₂);

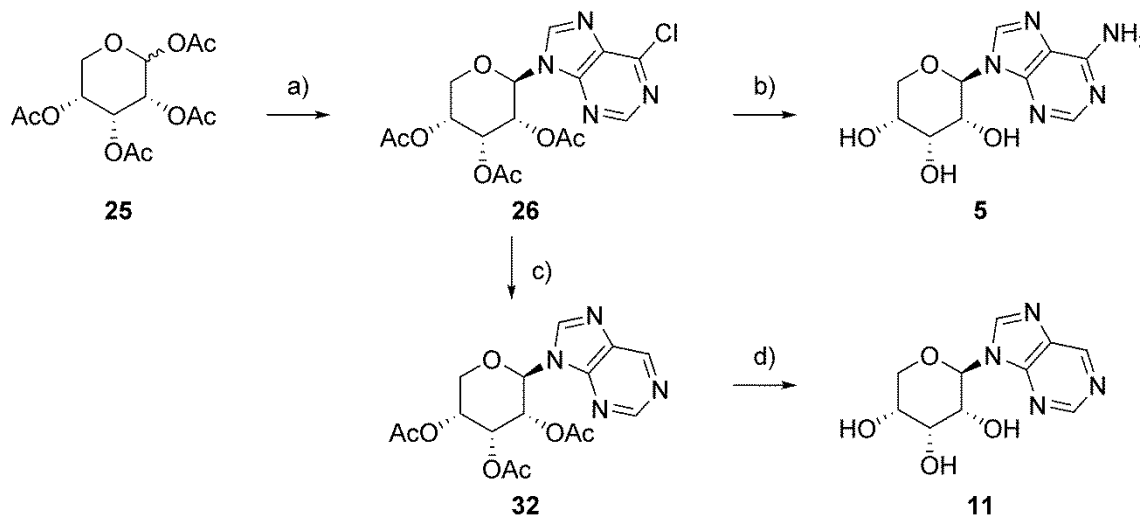
¹³C-NMR (101 MHz, D₆-DMSO): δ =167.6 (CHO), 166.0 (CHO), 163.0 (C₂), 161.7 (C₂), 161.6 (2 x C₆), 151.3 (C₄), 150.2 (C₄), 86.7 (C₅), 86.1 ppm (C₅);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3362 (w, NH₂), 3189 (m, OH), 1739 (m, CO) und 1639 (s, CONH);

HRMS (ESI⁻): ber. für: [C₅H₅N₄O₃]⁻ 169.0367, gefunden: 169.0368 [M-H]⁻.

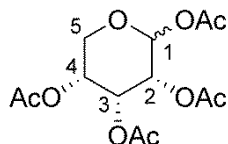
7.3 Synthese der Referenzverbindungen für präbiotische Koinjektions-Experimente

7.3.1 Synthese von β -pA (**5**) und β -pN (**22**)



Schema 20: Syntheseweg zu β -pA **5** und β -pN **22**. a) **26**, TMSOTf, BSA, 60 °C, 24 h, 57%; b) NH₃, rt, 41 h, 62%; c) MgO, THF/MeOH, Pd/C, H₂, rt, 1 h, 94%; d) NH₃, rt, 18 h, 64%.

7.3.1.1 β -D-Ribopyranose-1,2,3,4-tetraacetat (**25**)⁸⁴



D-Ribose (5.0 g, 33.30 mmol, 1.0 Äq) wurde in Pyridin (20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 90 min wurde Ac₂O (20.0 mL, 0.22 mol, 6.5 Äq) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h bei 0 °C gerührt und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde die Reaktionslösung in Eiswasser (100 mL) gegeben und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit wässriger HCl-Lösung (1 M) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM wurde *in vacuo* entfernt. Nach Umkristallisation aus Methanol (10 mL) wurde der Zucker **25** (6.24 g, 61%) als farblose Kristalle und ein Gemisch der α - und β -Form (3.84 g, 36%) als farbloses Öl erhalten.

Smp: 109 °C; **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 1:1): 0.55;

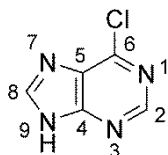
¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ =6.02 (d, ³J_{HC1,HC2}=4.8 Hz, 1H; HC1), 5.47 (dd, ³J_{HC3,HC2}=3.4 Hz, ³J_{HC3,HC4}=3.4 Hz, 1H; HC3), 5.14 (m, 1H; HC4), 5.03 (m, 1H; HC2), 4.01 (dd, ³J_{HaC5,HC4}=3.4 Hz, ²J_{HaC5,HbC5}=12.4 Hz, 1H; HaC5), 3.90 (m, 1H; HbC5), 2.12 (s, 3H; CH3), 2.09 (s, 3H; CH3), 2.08 (s, 3H; CH3), 2.08 ppm (s, 3H; CH3);

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3 , 27 °C): δ =169.9 (CO), 169.8 (CO), 169.4 (CO), 168.7 (CO), 90.89 (C1), 67.3 (C2), 66.2 (C3), 66.1 (C4), 62.7 (C5), 20.8 (CH3), 20.8 (CH3), 20.7 (CH3), 20.6 ppm (CH3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =1739 (s, CO), 1209 (s, COC) und (w, CH);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NaO}_9]^+$ 341.0843, gefunden: 341.0840 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

7.3.1.2 6-Chlorpurin (26)



Hypoxanthin (1.4 g, 10.27 mmol, 1.0 Äq) wurde in Phosphorylchlorid (7 mL) suspendiert und bei 90 °C für 5 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand vorsichtig mit Wasser *gequenched*. Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat mit Ammoniak konz. auf pH = 3 gebracht und erneut filtriert. Der Filterkuchen wurde mit kaltem Wasser und kaltem Diethylether gewaschen und *in vacuo* getrocknet um 6-Chlorpurin (1.25 g, 85%) als gelblichen Feststoff zu erhalten.

T_{Sm}: 193 °C; **R_f** (DCM/MeOH = 3:1): 0.89;

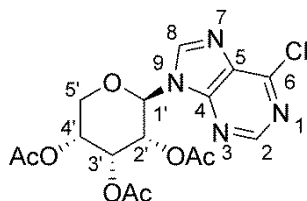
^1H -NMR (400 MHz, D_6 -DMSO): δ =8.74 (s, 1H; HC2), 7.69 ppm (s, 1H; HC8);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =1063 (w, Ar), 1603 (s, C=N) und 1571 (s, C=N);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_5\text{H}_2\text{ClN}_4]^-$ 152.9973, gefunden: 152.9972 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Werte überein.¹⁶⁴

7.3.1.3 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-adenin (27)



Unter Luftausschluss wurden Acetylribose **25** (161 mg, 0.51 mmol, 1.9 Äq) und 6-Chlorpurin **26** (40 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq) in Acetonitril (1 mL) suspendiert und *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (0.11 mL, 0.47 mmol, 1.8 Äq) wurde zugegeben. Das RG wurde auf 60 °C erwärmt und nach 0.5 h mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (0.09 mL, 0.51 mmol, 2.0 Äq) versetzt. Nach 24 h wurde das RG auf rt gebracht, in EtOAc aufgenommen und dreimal gegen ges. NaHCO_3 gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert

und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*Hex/EtOAc = 1:1 → 1:4) gereinigt um Nukleosid **27** (46 mg, 57%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Sm}: 75 – 77 °C; **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 2:1): 0.29;

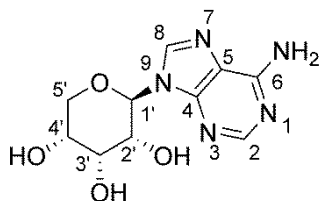
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=8.78 (s, 1H; C8), 8.26 (s, 1H; C2), 6.06 (d, ³*J*_{HC1',HC2'}=9.68 Hz, 1H; HC1'), 5.85 (dd, ³*J*_{HC3',HC4'}=2.32 Hz, ³*J*_{HC3',HC2'}=2.52 Hz, 1H; HC3'), 5.66 (dd, ³*J*_{HC2',HC3'}=2.84 Hz, ³*J*_{HC2',HC1'}=9.68 Hz, 1H; HC2'), 5.25 (ddd, ³*J*_{HC4',HC3'}=2.84 Hz, ³*J*_{HC4',HaC5'}=5.76 Hz, ³*J*_{HC4',HbC5'}=10.80 Hz, 1H; HC4'), 4.11 – 4.07 (m, 1H; HaC5'), 4.05 – 3.99 (m, 1H; HbC5'), 2.27 (s, 3H; CH₃), 2.05 (s, 3H; CH₃), 1.78 ppm (s, 3H; CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ=169.7 (CO), 169.3 (CO), 168.7 (CO), 152.4 (C2), 151.7 (C4), 151.6 (C6), 143.2 (C8), 131.7 (C5), 79.0 (C1'), 68.0 (C3'), 67.8 (C2'), 65.7 (C4'), 63.8 (C5'), 20.8 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.2 ppm (CH₃).

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =1746 (s, CONH), 1591 (m, Ar), 1562 (m, Ar), 1370 (m), 1241 (s), 1196 (vs, COC);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₁₆H₁₈ClN₄O₇]⁺ 413.0859, gefunden: 413.0859 [M+H]⁺.

7.3.1.4 9-β-D-Ribopyranosyladenin (5)



In ein Druckrohr mit Nukleosid **27** (20 mg, 0.05 mmol) wurde Ammoniak einkondensiert und bei rt für 41 h gerührt. Nach Abdampfen des Ammoniaks wurde das Rohprodukt mittels HPL Chromatographie gereinigt um Nukleosid **5** (8 mg, 62%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Zer}: 241 °C;

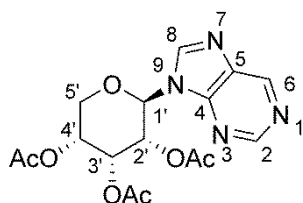
¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ=8.24 (s, 1H; C8), 8.18 (s, 1H; C2), 5.75 (d, ³*J*_{HC1',HC2'}=9.28 Hz, 1H; HC1'), 4.27 (dd, ³*J*_{HC2',HC3'}=2.84 Hz, ³*J*_{HC2',HC1'}=9.32 Hz, 1H; HC2'), 4.21 – 4.20 (m, 1H; HC3'), 3.94 (ddd, ³*J*_{HC4',HC3'}=2.58 Hz, ³*J*_{HC4',HbC5'}=4.92 Hz, ³*J*_{HC2',HaC5'}=10.62 Hz, 1H; HC4'), 3.89 (dd, ²*J*_{HaC5',HbC5'}=10.44 Hz, ³*J*_{HaC5',HC4'}=10.68 Hz, 1H; HaC5'), 3.77 ppm (dd, ³*J*_{HbC5',HC4'}=5.16 Hz, ²*J*_{HbC5',HaC5'}=10.44 Hz, 1H; HbC5');

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ=155.9 (C4), 152.4 (C2), 149.6 (C6), 140.2 (C8), 118.8 (C5), 80.8 (C1'), 71.4 (C3'), 68.8 (C2'), 66.7 (C4'), 65.2 ppm (C5');

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3215 (m, OH), 2939 (w, CH), 1663 (m, NH₂) und 1047 (m, COC);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₁₀H₁₄N₅O₄]⁺ 268.1040, gefunden: 268.1039 [M+H]⁺;

HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D → 80% HPLC Puffer C, 20% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionszeit = 15.3 min; Fluss 5 mL/min; Säule: VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec.

7.3.1.5 9-(2',3',4'-Tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-purin (**32**)⁹⁰

Nukleosid **27** (29 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq) wurde in THF abs. (1 mL) gelöst und MeOH abs. (2 mL) zugeben. Magnesiumoxid (3 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq) und Palladium auf Aktivkohle (10%, 7 mg) wurden zugeben und es wurde unter Normaldruck Wasserstoff für 1 h in die Reaktion eingeleitet. Das RG wurde filtriert und das LM *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 100:1) um Nukleosid **32** (25 mg, 94%) als farblosen Schaum zu erhalten.

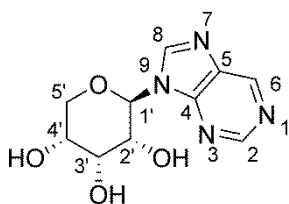
T_{Schm.}: 167 – 169 °C; **R_f** (DCM/MeOH = 5:1): 0.25;

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ =9.17 (s, 1H; HC6), 9.03 (s, 1H; HC2), 8.23 (s, 1H; HC8), 6.12 (d, ³J_{HC1',HC2'}=9.78 Hz, 1H; HC1'), 5.87 – 5.86 (m, 1H; HC3'), 5.68 (dd, ³J_{HC2',HC3'}=2.88 Hz, ³J_{HC2',HC1'}=9.60 Hz, 1H; HC2'), 5.28 – 5.25 (m, 1H; HC4'), 4.11 – 4.03 (m, 2H; C5'H₂), 2.28 (s, 3H; CH₃), 2.07 (s, 3H; CH₃), 1.77 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ =169.7 (CO), 169.3 (CO), 168.7 (CO), 153.0 (C2), 151.3 (C4), 149.1 (C6), 143.1 (C8), 134.0 (C5), 78.4 (C1'), 68.1 (C3'), 67.9 (C2'), 65.8 (C4'), 63.7 (C5'), 20.8 (CH₃), 20.6 (CH₃), 20.2 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =1746 (s, COOR) und 1210 (s, COC);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₁₆H₁₉N₄O₇]⁺ 379.1248, gefunden:379.1248 [M+H]⁺.

7.3.1.6 9- β -D-Ribopyranosylpurin, (**22**)

Nukleosid **32** (19 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq) wurde in methanolischem Ammoniak (7N) gelöst und für 18 h bei rt gerührt. Das RG wurde *in vacuo* eingengt und mittels HPL Chromatographie gereinigt um β -pN **22** (8 mg, 65%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Zer.}: 197 °C;

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ =9.16 (s, 1H; HC2), 8.95 (s, 1H; HC6), 8.67 (s, 1H; HC8), 5.92 (d, ³J_{HC1',HC2'}=9.56 Hz, 1H; HC1'), 4.51 (dd, ³J_{HC2',HC3'}=2.80 Hz, ³J_{HC2',HC1'}=9.56 Hz, 1H; HC2'), 4.38 – 4.6 (m, 1H; HC3'), 4.15 – 4.10 (m, 1H; HC4'), 3.94 – 3.91 ppm (m, 2H; C5'H₂);

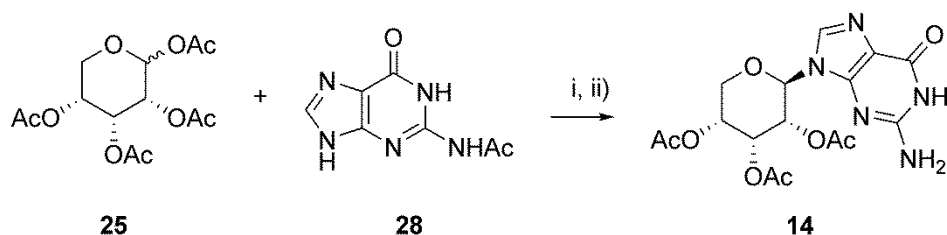
^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ =152.1 (C4), 151.0 (C6), 148.2 (C2), 146.1 (C8), 133.6 (C5), 80.9 (C1'), 70.6 (C3'), 68.0 (C2'), 65.9 (C4'), 64.9 ppm (C5');

IR (cm^{-1}): 3228 (br, m, OH), 2887 (w, CH), 1587 (m), 1209 (s, COC) und 1098 (s, CHOH);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4]^+$ 253.0931, gefunden: 253.0930 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

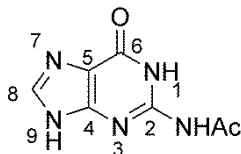
HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D \rightarrow 90% HPLC Puffer C, 10% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionszeit = 17.3 min; Fluss 5 mL/min; Säule: VP 250/21 Nucleosil 100-7 C18.

7.3.2 Synthese von β -pG (**14**)



Schema 21: Synthese von β -pG **14**. i) BSA, TMSOTf, MeCN, 60 °C, 19 h; ii) NH_3 , rt.

7.3.2.1 N-2-Acetylguanine (**28**)⁸⁸



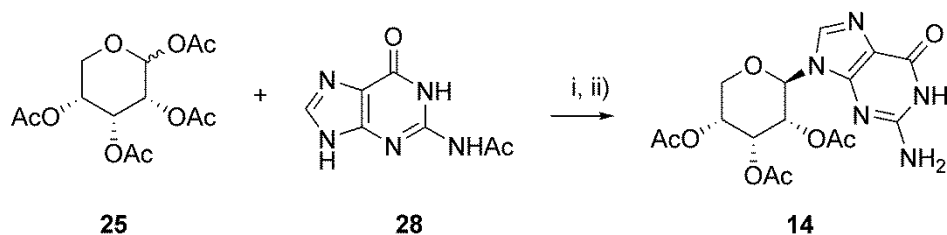
Guanin (595 mg, 3.94 mmol, 1.0 Äq) wurde in Dimethylacetamid (4.5 mL) suspendiert und mit Essigsäureanhydrid (0.96 mL, 10.24 mmol, 2.6 Äq) versetzt und anschließend 48 h bei 160 °C erhitzt. Das LM wurde abgenommen und der Feststoff getrocknet um Base **28** (548 mg, 72%) als hellbraunen Feststoff zu erhalten.

T_{zer}: 324 °C; **R_f** (DCM/MeOH = 3:1): 0.72;

^1H -NMR (200 MHz, D_6 -DMSO, 23 °C): δ =12.02 (s, 1H; NH), 11.56 (s, 1H; NH), 8.03 (s, 1H; HC8), 2.17 ppm (s, 3H; CH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =3058 (w, NH), 1682 (s, CONH), 1613 (s, NHCO) und 1380 (m, CH_3);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_5\text{O}_2]^+$ 194.0673, gefunden: 194.0673 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.3.2.2 9- β -D-Ribopyranosylguanin (**14**)

Unter Luftausschluss wurden Acetylribose **25** (329 mg, 1.04 mmol, 2.0 Äq) und Acetylguanin **28** (100 mg, 0.52 mmol, 1.0 Äq) in Acetonitril (3.7 mL) suspendiert und *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (0.32 mL, 1.30 mmol, 2.5 Äq) wurde zugegeben. Das RG wurde auf 60 °C erwärmt und nach 0.5 h mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (0.28 mL, 1.55 mmol, 3.0 Äq) versetzt. Nach 19 h wurde das RG auf rt gebracht, in EtOAc aufgenommen und dreimal mit ges. NaHCO₃ gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gegen EtOAc reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 50:1 → 10:1) gereinigt, um das Rohprodukt als braunen Feststoff zu erhalten. Dieses wurde in einem Druckrohr mit Ammoniak einkondensiert und bei rt für 48 h gerührt. Nach Abdampfen des Ammoniaks wurde das Rohprodukt mittels HPL Chromatographie gereinigt, um β -pG **14** (47 mg, 32%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{zer}: 230 °C;

¹H-NMR (600 MHz, D₆-DMSO): δ =10.59 (s, 1H; NH), 7.82 (s, 1H; HC8), 6.48 (s, 2H; NH₂), 5.45 (d, ³J_{HC1',HC2'}=9.36 Hz, 1H; HC1'), 5.04 – 5.02 (m, 2H; OH), 4.85 (d, ³J_{OH,HC2'}=6.30 Hz, 1H; C2'OH), 4.04 – 4.00 (m, 2H; HC2', HC3'), 3.69 – 3.67 (m, 1H; HC4'), 3.63 – 3.52 ppm (m, 2H; C5'H₂);

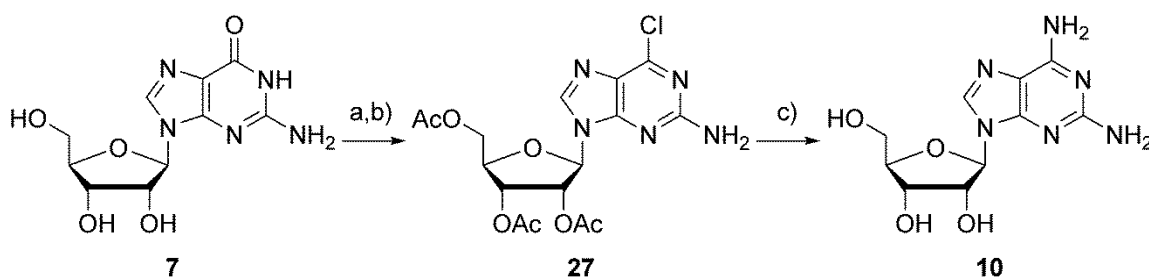
¹³C-NMR (151 MHz, D₆-DMSO): δ =157.2 (C6), 154.1 (C2), 152.3 (C4), 136.1 (C8), 116.8 (C5), 79.3 (C1'), 71.7 (C3'), 68.7 (C2'), 65.5 (C4'), 65.5 ppm (C5').

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3337 (br, m, OH), 2931 (w, CH), 1635 (s, NH₂), 1590 (s, NH₂), 1072 (s, CHOH) und 1037 (s, COC);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₁₀H₁₄N₅O₄]⁺ 268.1040, gefunden: 268.1039 [M+H]⁺.

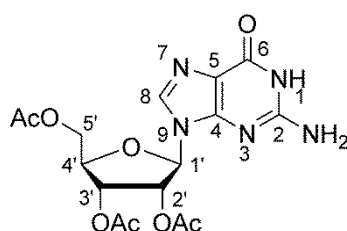
HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D → 80% HPLC Puffer C, 20% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionszeit = 26.2 min; Fluss 15 mL/min; Säule: VP 250/32 Nucleosil 100-7 C18.

7.3.3 Synthese von β -fDN (9)



Schema 22: Synthese von β -fDN 9. a) Ac_2O , DMAP, 40 °C, 48 h, 95%; b) TEACl, DMA, POCl_3 , 100 °C, 10 min, 87%; c) NH_3 , rt, 48 h, 67%.

7.3.3.1 9-(2',3',5'-Tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-guanin (29)



Guanosin **7** (1 g, 3.53 mmol, 1.0 Äq) wurde in Ac_2O (50 mL) gelöst und DMAP (4 mg, 0.04 mmol, 1 mol%) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 40 °C erwärmt und 48 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und Produkt **29** ohne weitere Aufarbeitung als farblosen Feststoff (1.37 g, 95%) erhalten.

T_{sm} : 81 °C; R_f (DCM/MeOH = 4:1): 0.54;

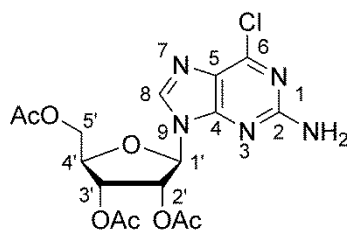
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_6 -DMSO): δ =10.74 (s, 1H; NH), 7.92 (s, 1H; HC8), 6.53 (s, 2H; NH_2), 5.98 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=6.04$ Hz, 1H; HC1'), 5.80 – 5.78 (m, 1H; HC2'), 5.49 (dd, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC2}'}=4.08$ Hz, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC4}'}=5.96$ Hz, 1H; HC3'), 4.39 – 4.23 (m, 3H; HC4', C5'H₂), 2.11 (s, 3H; CH₃), 2.04 (s, 3H; CH₃), 2.03 ppm (s, 3H; CH₃);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_6 -DMSO): δ =170.5 (CO), 169.9 (CO), 169.7 (CO), 157.5 (C2), 154.3 (C6), 151.5 (C4), 136.1 (C8); 117.2 (C5), 84.8 (C1'), 80.0 (C4'), 72.5 (C2'), 70.7 (C3'), 63.5 (C5'), 21.0 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.6 ppm (CH₃);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =1746 (s, CO), 1699 (s, NH_2), 1218 (s, CH₂) und 1072 (m, NH_2);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_8]^+$ 410.1306, gefunden: 410.1308 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.3.3.2 6-Chlor-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-guanin (**30**)⁸⁹



Das acetylierte Guanosin **29** (1 g, 2.44 mmol, 1.0 Äq) wurde in Acetonitril (5 mL) gelöst, mit Tetraethylammoniumchlorid (810 mg, 4.89 mmol, 2.0 Äq), *N,N*-Dimethylanilin (0.31 mL, 2.44 mmol, 1.0 Äq) und Phosphorylchlorid (1.34 mL, 14.66 mmol, 6.0 Äq) gelöst und 10 min bei 100 °C gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und zweimal mit Chloroform gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 50:1) gereinigt, um Nukleosid **30** (912 mg, 87%) als gelben Schaum zu erhalten.

T_{sm}: 76 °C; **R_f** (DCM/MeOH = 10:1): 0.54;

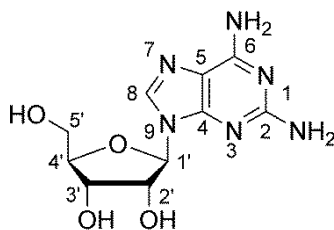
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ =7.88 (s, 1H; HC8), 5.99 (d, ³J_{HC1',HC2'}=4.98 Hz, 1H; HC1'), 5.93 – 5.92 (m, 1H; HC2'), 5.71 (dd, ³J_{HC3',HC2'}=5.10 Hz, ³J_{HC3',HC4'}=5.10 Hz, 1H; HC3'), 4.44 – 4.33 (m, 3H; HC4', C5'H₂), 2.12 (s, 3H; CH₃), 2.08 (s, 3H; CH₃), 2.06 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ =170.4 (C5'OCO), 169.5 (C3'OCO), 169.3 (C2'OCO), 160.0 (C2), 153.0 (C4), 151.7 (C6), 140.7 (C8); 125.6 (C5), 86.6 (C1'), 80.0 (C4'), 72.7 (C2'), 70.4 (C3'), 62.9 (C5'), 20.6 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.4 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =1742 (s, CO), 1611 (s, NH₂), 1214 (s, CH₂) und 1045 (m, NH₂);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₁₆H₁₉ClN₅O₇]⁺ 428.0968, gefunden: 428.0970 [M+H]⁺.

7.3.3.3 2-Amino-9- β -D-ribofuranosyladenin (**9**)



In ein Druckrohr mit Nukleosid **30** (50 mg, 0.12 mmol) wurde Ammoniak einkondensiert und bei rt 48 h gerührt. Nach Abdampfen des Ammoniaks wurde das Rohprodukt mittels HPL Chromatographie gereinigt, um β -fDN **9** (22 mg, 67%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{zer}: 233 °C;

¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ =7.91 (s, 1H; HC8), 6.76 (s, 2H; NH₂), 5.71 (s, 2H; NH₂), 5.70 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=6.32$ Hz, 1H; HC1'), 4.50 (dd, $^3J_{\text{HC2}',\text{HC3}'}=5.08$ Hz, $^3J_{\text{HC2}',\text{HC1}'}=6.32$ Hz, 1H; HC2'), 4.09 (dd, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC4}'}=2.92$ Hz, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC2}'}=4.96$ Hz, 1H; HC3'), 3.91 – 3.88 (m, 1H; HC4'), 3.63 (dd, $^3J_{\text{HaC5}',\text{HC4}'}=3.60$ Hz, $^2J_{\text{HaC5}',\text{HbC5}'}=12.08$ Hz, 1H; HaC5'), 3.53 ppm (dd, $^3J_{\text{HbC5}',\text{HC4}'}=3.52$ Hz, $^2J_{\text{HbC5}',\text{HaC5}'}=12.00$ Hz, 1H; HbC5');

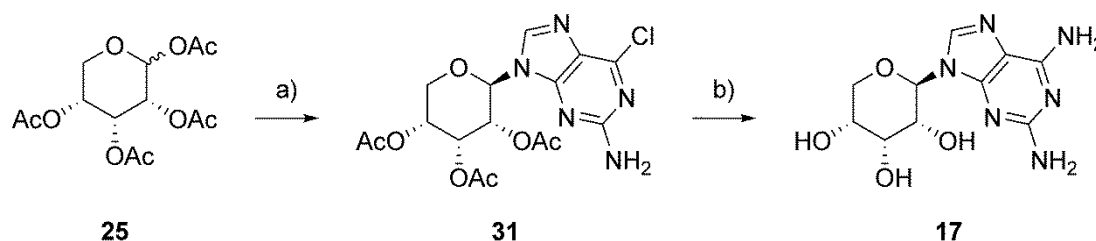
¹³C-NMR (101 MHz, D₆-DMSO): δ =160.5 (C2), 156.7 (C4), 151.9 (C6), 136.6 (C8); 114.0 (C5), 87.4 (C1'), 85.9 (C4'), 73.6 (C2'), 71.1 (C3'), 62.2 ppm (C5');

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3175 (m, OH), 1653 (s, C=N), 1596 (s, Ar), 1111 (m, COC), und 1059 (s, CH₂OH);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₁₀H₁₅N₆O₄]⁺ 283.1149, gefunden: 283.1150 [M+H]⁺;

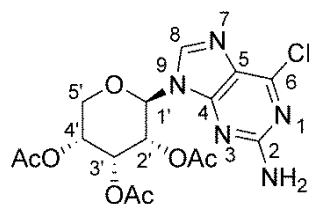
HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D → 60% HPLC Puffer C, 40% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionszeit = 27.3 min; Fluss 15 mL/min; Säule: VP 250/32 Nucleosil 100-7 C18.

7.3.4 Synthese von β -pDN (17)



Schema 23: Synthese zu β -pDN. a) BSA, TMSOTf, MeCN, 60 °C, 20 h, 44%; b) NH₃, rt, 48 h, 68%.

7.3.4.1 6-Chlor-9-(2',3',4'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-guanin (31)



Unter Luftausschluss wurden Acetylribose **25** (421 mg, 1.32 mmol, 0.8 Äq) und 2-Amino-6-chlorguanin (300 mg, 1.77 mmol, 1.0 Äq) in Acetonitril (6 mL) suspendiert und *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (1.1 mL, 4.41 mmol, 2.5 Äq) wurde zugegeben. Das RG wurde auf 60 °C erwärmt und nach 0.5 h mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (0.96 mL, 5.29 mmol, 3.0 Äq) versetzt. Nach 2 h wurden weiter 0.5 eq der acetylgeschützten Ribose (421 mg, 1.32 mmol, 0.8 Äq) zugegeben. Nach 19 h bei 60 °C wurde das RG auf rt gebracht, in EtOAc aufgenommen und dreimal mit ges. NaHCO₃ gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch (EtOAc/iHex = 1:2→5:1) gereinigt, um Nukleosid **31** (332 mg, 44%) als hellgelben Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 102 °C; **R_f** (DCM/MeOH=10:1): 0.51;

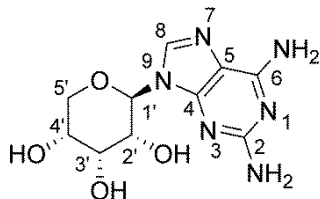
¹H-NMR (400 MHz, D₆-DMSO): δ=8.41 (s, 1H; HC8), 5.95 (dd, ³J_{HC2',HC1'}=9.60 Hz, ³J_{HC2',HC3'}=2.96 Hz, 1H; HC2'), 5.83 (d, ³J_{HC1',HC2'}=9.68 Hz, 1H; HC1'), 5.76 – 5.74 (m, 1H; HC3'), 5.10 – 5.15 (m, 1H; HC4'), 4.04 (dd, ³J_{HaC5',HC4'}=4.80 Hz, ²J_{HaC5',HbC5'}=11.04 Hz, 1H; HaC5'), 3.96 – 3.90 (m, 1H; HbC5'), 2.23 (s, 3H; CH₃), 2.01 (s, 3H; CH₃), 1.80 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (101 MHz, D₆-DMSO): δ=170.3 (CO), 169.7 (CO), 169.2 (CO), 160.4 (C2), 154.4 (C4), 150.2 (C6), 141.4 (C8), 123.5 (C5), 78.0 (C1'), 67.8 (C3'), 67.6 (C2'), 66.0 (C4'), 63.1 (C5'), 21.1 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.5 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3441 (w), 3210 (w), 1753 (m), 1735 (m), 1612 (m), 1377 (w), 1256 (s), 1230 (s), 1170 (s), 1070 (m), 1035 (vs), 975 (m);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₁₆H₁₉ClN₅O₇]⁺ 428.0968, gefunden: 428.0966 [M+H]⁺.

7.3.4.2 2-Amino-9-β-D-ribofuranosyladenin (**17**)



In einem Druckrohr mit Nukleosid **31** (27 mg, 0.06 mmol) wurde Ammoniak einkondensiert und 48 h bei rt gerührt. Das Rohprodukt wurde an der HPL Chromatographie gereinigt, um β-pDN **17** (11 mg, 68%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{zer}: 241 °C;

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ=8.09 (s, 1H; HC8), 5.62 (d, ³J_{HC1',HC2'}=9.04 Hz, 1H; HC1'), 4.34 – 4.31 (m, 2H; HC2', HC3') und 4.07 – 4.02 ppm (m, 1H; HC4'), 3.91 – 3.81 (m, 2H; C5'H₂);

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ=153.6 (C2), 151.1 (C4), 151.0 (C6), 140.1 (C8), 111.7 (C5), 80.1 (C1'), 80.7 (C3'), 68.1 (C2'), 65.9 (C4'), 64.8 ppm (C5');

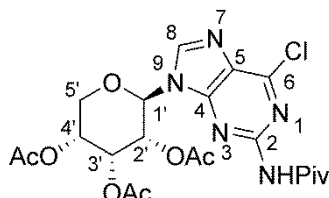
IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3322 (br, m, OH), 1688 (m, NH₂), 1650 (s, NH₂) und 1039 (s, COC);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₁₀H₁₅N₆O₄]⁺ 283.1149, gefunden: 283.1148 [M+H]⁺;

HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D → 80% HPLC Puffer C, 20% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionszeit = 12.1 min; Fluss 5 mL/min; Säule: VP 250/10 *Nucleosil* 100-7 C18.

Die ersten Versuche, β -pDN über die pivaloyl oder acetyl geschützte Base zu erhalten scheiterten an der ineffizienten Entfernung der Schutzgruppe. Dies war lediglich in Spuren zu detektieren. Die pivaloyl-geschützte, an der Position 6 mit Chlor substituierte Base wurde von Dr. Julian Willibald synthetisiert.

7.3.4.3 6-Chlor-N-2-pivaloyl-9-(2',3',4'-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9H-guanin



Unter Luftausschluss wurden Acetylribose **25** (141 mg, 0.44 mmol, 1.4 Äq) und Piv-Cl-Guanin (80 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äq) in Acetonitril (2.2 mL) suspendiert und *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (0.19 mL, 0.79 mmol, 2.5 Äq) wurde zugegeben. Das RG wurde auf 60 °C erwärmt und nach 0.5 h mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (0.17 mL, 0.95 mmol, 3.0 Äq) versetzt. Nach 24 h wurde das RG auf rt gebracht, in EtOAc aufgenommen und dreimal mit ges. NaHCO₃ gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*Hex/EtOAc = 1:1) gereinigt um das Acetyl und Pivaloyl-geschützte Nukleosid (71 mg, 44%) als hellbraunen Feststoff zu erhalten.

T_{zer}: 113 °C; **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 1:8): 0.48;

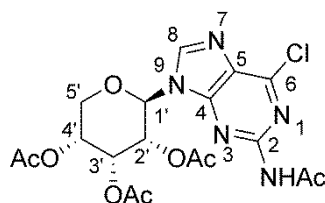
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ =8.22 (s, 1H; NH), 8.12 (s, 1H; HC8), 6.06 (d, ³*J*_{HC1',HC2'}=9.64 Hz, 1H; HC1'), 5.86 – 5.84 (m, 1H; HC3'), 5.63 (dd, ³*J*_{HC2',HC3'}=2.92 Hz, ³*J*_{HC2',HC1'}=9.64 Hz, 1H; HC2'), 5.22 (td, ³*J*_{HC4',HC3'}=2.84 Hz, ³*J*_{HC4',C5'H2}=8.28 Hz, 1H; HC4'), 4.04 (d, ³*J*_{C5'H2,HC4'}=8.48 Hz, 2H; C5'H₂), 2.28 (s, 3H; CH₃), 2.06 (s, 3H; CH₃), 1.82 (s, 3H; CH₃), 1.37 ppm (s, 9H; (CH₃)₃);

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ =175.5 (COPiv), 169.9 (CO), 169.4 (CO), 168.9 (CO), 152.9 (C6), 152.5 (C2), 151.5 (C4), 142.3 (C8), 128.3 (C5), 78.6 (C1'), 67.9 (C3'), 67.6 (C2'), 65.8 (C4'), 63.7 (C5'), 40.4 (C(CH₃)₃), 27.4 (3C; C(CH₃)₃), 20.8 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.2 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3349 (w, CONH), 2967 (w, CH), 1752 (s, CONH), 1395 (m, (CH₃)₃), 1216 (s, C(CH₃)₃);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₂₁H₂₆ClN₅NaO₈]⁺ 534.1362, gefunden: 534.1365 [M+Na]⁺.

7.3.4.4 6-Chlor-*N*-2-acetyl-9-(2',3',4'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-guanin



Vierfach Acetyl-geschütztes Guanosin (100 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq), Tetraethylammoniumchlorid (73 mg, 0.44 mmol, 2.0 Äq), DMA (28 μ L, 0.22 mmol, 1.0 Äq) und Phosphorylchlorid (122 μ L, 1.33 mmol, 6.0 Äq) wurden in MeCN (1 mL) gelöst und für 10 min bei 100 °C gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 60:1 \rightarrow 10:1) gereinigt um das vierfach Acetyl-geschütztes 6-Chlor-guanosin (64 mg, 56%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Zer}: 102 °C; **R_f** (DCM/MeOH = 10:1): 0.48;

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ =8.18 (s, 1H; NH), 8.10 (s, 1H; HC8), 5.92 (d, ³J_{HC1',HC2'}=9.60 Hz, 1H; HC1'), 5.85 – 5.84 (m, 1H; HC3'), 5.64 (dd, ³J_{HC2',HC3'}=2.70 Hz, ³J_{HC2',HC1'}=9.60 Hz, 1H; HC2'), 5.22 (td, ³J_{HC4',HC3'}=2.76 Hz, ³J_{HC4',HaC5'}=5.64 Hz, 1H; HC4'), 4.08 (ddd, ⁴J_{HaC5',HC3'}=0.96 Hz, ³J_{HaC5',HC4'}=5.64 Hz, ²J_{HaC5',HbC5'}=11.11 Hz, 1H; HaC5'), 4.01 – 3.98 (m, 1H; HbC5'), 2.58 (s, 3H; CH₃), 2.25 (s, 3H; CH₃), 2.06 (s, 3H; CH₃), 1.81 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ =170.5 (CO), 169.6 (CO), 169.3 (CO), 168.7 (CO), 152.9 (C6), 152.5 (C2), 151.5 (C4), 142.4 (C8), 128.0 (C5), 79.0 (C1'), 68.0 (C3'), 67.7 (C2'), 65.7 (C4'), 63.8 (C5'), 25.8 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.2 ppm (CH₃);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₁₈H₂₁ClN₅O₈]⁺ 470.1073, gefunden: 470.1070 [M+H]⁺.

7.4 Präbiotische Syntheseansätze

7.4.1 Reaktionsbedingungen der präbiotischen Synthese von Adenosin und Adenosinderivaten

Die präbiotischen Reaktionen wurden in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Die Reaktanten wurden wie in Tabelle 7 beschrieben in Wasser suspendiert und bei verschiedenen Temperaturen auf 450 rpm geschüttelt. Massenspektrometrische Untersuchungen der Ribosephosphat-Experimente erfolgen mittel LC-MS mit Tripl-Quad Detektion der entstandenen Produkte.

Tabelle 7: Präbiotische Reaktionsbedingungen für die Adenosinderivate. FaPyA (**2**)– 2-Amino-5-formamidopyrimidin.

Nr.	FaPyA [mg]	Salz [mg]	Ribose [mg]	H ₂ O [mL]	t[h]/T[°C]
1	25	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O [23]	20	1	46/90
2	9	-	9 x 9	0.5	74/85
3	7	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [9 x 7]	9 x 7	0.4	74/85
4	8	(NH ₄)HCO ₃ [9 x 4]	9 x 8	0.5	74/85
5	9	CaCO ₃ [9 x 7]	9 x 9	0.5	74/85
6	10	(NH ₄)HCO ₃ [22 x 5]	22 x 10	0.4	175/85
7	9	(NH ₄)HCO ₃ [22 x 5]	22 x 9	0.4	175/120
8	9	(NH ₄)HCO ₃ [5 x 5] + Borax [21]	16 x 9	0.4	74/85
29	20	-	20	1	48/85
30	20	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [20]	20	1	70/85
31	25	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [25]	25	-	72/80
32	30	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [31]	29	1	72/45
33	20	Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ [66]	20	1	46/90
34	20	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O/MgCl ₂ [20/12]	20	1	46/90
35	20	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [34]	20	1	46/90
36	20	Na ₃ P ₃ O ₉ [40]	20	1	46/90
37	6	Na ₃ P ₃ O ₉ [18]	6	250	2976/25
38	20	Na ₄ O ₄ P ₂ ·10H ₂ O [58]	20	1	46/90
39	10	CaCO ₃ [7]	10	0.5	62/85
40	10	(NH ₄)HCO ₃ [5]	10	0.5	62/85
41	10	Na ₂ CO ₃ [7]	10	0.5	62/85

Tabelle 8: Präbiotische Reaktionsbedingungen für die Adenosinderivate mit Ribose-5-phosphat (P-Ribose). FaPyA (**2**)– 2-Amino-5-formamidopyrimidin.

Nr.	FaPyA [mg]	Salz [mg]	P-Ribose [mg]	H ₂ O [mL]	t[h]/T[°C]
42	5	-	5	0.4	74/85
43	6	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [6]	6	0.4	74/85
44	8	(NH ₄)HCO ₃ [4]	8	0.4	74/85

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen der präbiotischen Synthese von Tetrosen (C4-Zuckern). A – 2-Amino-5-formamidopyrimidin (**2**).

Nr.	FaPyA [mg]	Salz [mg]	C4 [mg]	H ₂ O [mL]	t[h]/T[°C]
14	7	(NH ₄)HCO ₃ [4]	L-(+)-Threose [6]	1	74/85
15	7	(NH ₄)HCO ₃ [4]	D-(-)-Erythrose [6]	1	74/85

7.4.2 Reaktionsbedingungen der präbiotischen Synthese von Guanosin und Guanosinderivaten

Tabelle 10: Präbiotische Bedingungen mit Ribose für die Synthese von RNA Nukleosidderivaten. G – 2,4-Diamino-6-oxo-5-formamidopyrimidin (**13**). DN – 2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin (**18**), X – 4-Amino-2,6-dihydroxy-5-formamidopyrimidin (**17**).

Nr.	FaPy [mg]	Salz [mg]	Ribose [mg]	H ₂ O [mL]	t[h]/T[°C]
45	G [20]	-	18	1	48/85
46	G [30]	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [27]	27	1	48/80
47	G [20]	Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ [59]	18	1	336/85
48	G [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [31]	18	1	336/85
49	G [20]	Na ₃ P ₃ O ₉ [36]	18	1	336/85
50	G [30]	Na ₄ O ₄ P ₂ ·10H ₂ O [79]	27	1	48/80
51	G [20]	CaCO ₃ [12]	18	1	62/85
52	G [20]	(NH ₄)HCO ₃ [9]	18	1	62/85
53	G [20]	Na ₂ CO ₃ [13]	18	1	62/85
54	DN [20]	-	18	1	48/85
55	DN [20]	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [19]	18	1	48/85
56	DN [20]	Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ [60]	18	1	48/85
57	DN [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [31]	18	1	48/85
58	DN [20]	Na ₃ P ₃ O ₉ [36]	18	1	48/85
59	DN [20]	Na ₄ O ₄ P ₂ ·10H ₂ O [53]	18	1	48/85
60	DN [10]	CaCO ₃ [6]	9	0.5	62/85
61	DN [10]	(NH ₄)HCO ₃ [5]	9	0.5	62/85
62	DN [10]	Na ₂ CO ₃ [6]	9	0.5	62/85
63	X [20]	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O [18]	18	1	48/85
64	X [20]	Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ [59]	18	1	48/85
65	X [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [31]	18	1	48/85
66	X [20]	Na ₃ P ₃ O ₉ [36]	18	1	48/85

7.4.3 Reaktionsbedingungen präbiotischer Synthesen unter formoseähnlichen Bedingungen

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der präbiotischen Synthese mit Verknüpfung an die Formose-Reaktion. A – 2-Amino-5-formamidopyrimidin (**2**), G – 2,4-Diamino-6-oxo-5-formamidopyrimidin (**13**). DN – 2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin (**18**).

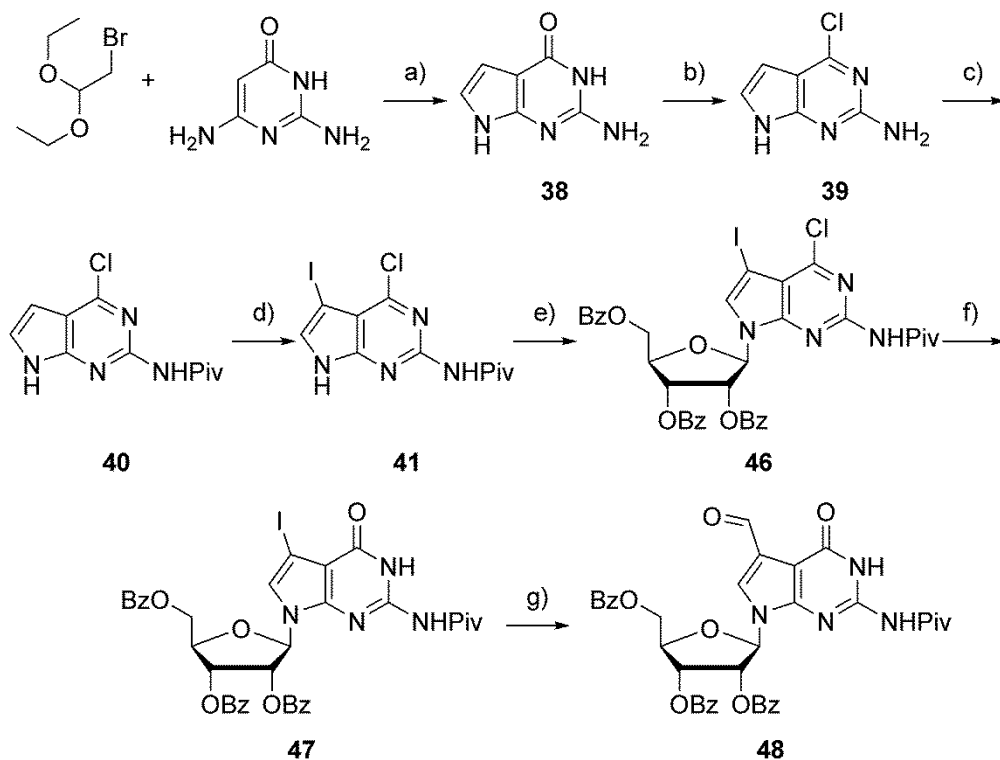
Nr.	FaPy [mg]	Salz [mg]	H ₂ O [mL]	C1 [mg]	C2 [mg]	C3 [mg]	Borax [mg]	X(OH) ₂ [mg]	t[h]/T[°C]
9	A [13]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [14]	1	-	6	9	37	Ca [7]	168/85
10	A [20]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [20]	1	12	8	12	51	Ca [10]	504/85
11	A [20]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [20]	1	12	8	-	50	Ca [10]	168/85
12	A [20]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [20]	1	12	8	12	50	Ba [41]	105/85
13	A [10]	(NH ₄)HCO ₃ [5]	0.5	6	4	6	24	Ca [5]	268/85
16	G [21]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [20]	1	-	7	11	46	Ca [9]	168/85
17	G [21]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [20]	1	11	7	11	48	Ca [9]	336/85
18	G [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [31]	1	-	7	11	45	Ca [9]	168/85
19	G [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [31]	1	11	7	11	45	Ca [9]	320/85
20	G [20]	Na ₃ P ₃ O ₉ [36]	1	11	7	11	45	Ca [9]	320/85
21	DN [20]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [19]	1	11	7	11	45	Ca [9]	320/85
22	DN [22]	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O [19]	1	22	7	-	45	Ca [9]	320/85
23	DN [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [32]	1	16	7	10	46	Ca [9]	320/85
24	DN [20]	Mg ₃ (PO ₄) ₂ [32]	1	-	7	11	46	Ca [9]	320/85
25	DN [20]	Na ₃ P ₃ O ₉ [36]	1	16	7	11	45	Ca [9]	320/85
26	DN [20]	Na ₃ P ₃ O ₉ [36]	1	-	7	11	45	Ca [9]	320/85
27	DN [20]	Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ [60]	1	16	7	10	45	Ca [9]	320/85
28	DN [20]	Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ [60]	1	-	7	11	45	Ca [9]	320/85

Tabelle 12: Reaktionsauswertung zu den Guanosin und Diaminonebularin Derivaten unter formoseähnlichen Bedingungen. f – furanosyl; p – pyranosyl.

Nr.	β -f	β -p	Nr.	β -f	β -p
9	✓	✓	20	-	-
10	✓	✓	21	✓	-
11	✓	-	22	-	-
12	✓	✓	23	-	-
13	✓	✓	24	✓	✓
16	-	-	25	-	-
17	-	-	26	✓	✓
18	✓	-	27	✓	✓
19	-	-	28	✓	✓

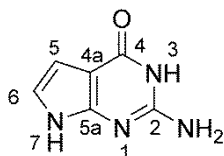
7.5 Synthese der hypermodifizierten 7-Desazaguanosinderivaten

7.5.1 Synthese von 7-Desazaguanosinaldehyd **48**^{141,145}



Schema 24: Synthese zum Aldehyd **48**. a) i) HCl (konz.), H₂O, 90 °C, 1 h; ii) NaOAc, 80 °C, 2 h, 75%; b) POCl₃, 90 °C, 2 h; c) PivCl, Pyridin, rt, 2 h, über 2 Stufen 54%; d) NIS, THF, rt, 1 h, 86%; e) BSA, TMSOTf, 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranose, MeCN, 50 °C, 24 h, 52%; f) CsOAc, NEt₃, DABCO, DMF, rt, 45 h, 57%; g) Pd₂(dba)₃, P(Ph₃)₃, Bu₃SnH, CO, Toluol, 55 °C, 6 h, 5 bar, 91%.

7.5.1.1 2-Amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (7-Desazaguanosin, **38**)



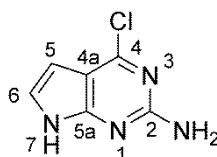
Bromacetaldehyd-diethylacetal (30.9 mL, 206.5 mmol, 1 Äq) wurde in Wasser (120 mL) suspendiert und mit HCl konz. (4.5 mL) versetzt. Die Suspension wurde bei 90 °C für 1 h gerührt, bis sich eine klare Lösung gebildet hatte. Die Lösung wurde auf rt gekühlt und mit Natriumacetat (20.3 g, 247.5 mmol, 1.2 Äq) versetzt. Der Lösung wurde eine Suspension aus 2,6-Diamino-4-pyrimidon (30.0 g, 237.9 mmol, 1.2 Äq) in Wasser (200 mL) zugegeben und bei 80 °C für 2 h gerührt. Die erhaltene Suspension wurde bei 0 °C für 1.5 h gerührt, der erhaltene Niederschlag abfiltriert und mit ein wenig kaltem Wasser und Aceton gewaschen. Der Niederschlag wurde *in vacuo* getrocknet um 7-Desazaguanin **38** (16.1 g, 75%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ =10.95 (s, 1H; NH), 10.28 (s, 1H; NHCO), 6.60 (dd, $^3J_{\text{HC5,NH}}=2.24$, $^3J_{\text{HC5,HC6}}=3.44$ Hz, 1H; HC5), 6.18 (dd, $^3J_{\text{HC6,NH}}=2.16$, $^3J_{\text{HC6,HC5}}=3.32$ Hz, 1H; HC6), 6.08 ppm (s, 2H; NH_2);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ =159.3 (C4), 152.7 (C2), 151.6 (C5a), 117.0 (C6), 102.0 (C4a), 100.3 ppm (C5);

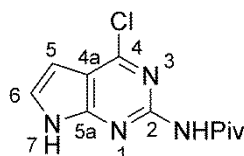
HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_4\text{O}]^+$ 151.0614, gefunden: 151.0615 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.1.2 2-Amino-4-chlor-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (39)



7-Desazaguanin **38** (10.0 g, 66.6 mmol) wurde in POCl_3 (100 mL) suspendiert und bei 90 °C für 2 h unter Rückfluss gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand vorsichtig mit Wasser *gequencht* und der dabei entstandene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Ammoniak konz. auf pH = 2 gebracht und eine Stunde bei 0 °C stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser und Diethylether gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Das gelbe Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung in die nächste Reaktion eingesetzt.

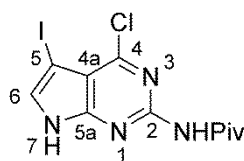
7.5.1.3 4-Chlor-2-pivaloylamino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (40)



Base **39** (2.7 g, 16.08 mmol, 1 Äq) wurde in trockenem Pyridin (34 mL) suspendiert und mit Pivaloylchlorid (6.96 mL, 56.28 mmol, 3.5 Äq) versetzt. Die Suspension wurde 2 h bei rt gerührt und darauf das LM *in vacuo* entfernt. Die übriggebliebene Suspension wurde in DCM aufgenommen und zweimal mit HCl (0.1 M) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 98:2) gereinigt um **40** (1.3 g, 54%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ =12.19 (s, 1H; CONH), 8.36 (s, 1H; NH), 7.55 (dd, $^3J_{\text{HC5,NH}}=2.48$, $^3J_{\text{HC5,HC6}}=3.68$ Hz, 1H; HC5), 6.53 (dd, $^3J_{\text{HC6,NH}}=1.84$, $^3J_{\text{HC6,HC5}}=3.66$ Hz, 1H; HC6), 1.39 ppm (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

7.5.1.4 4-Chlor-5-iod-2-pivaloylamino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (41)



Base **40** (2.01 g, 7.97 mmol, 1 Äq) wurde in einem mit Aluminiumfolie ummantelten Kolben in THF abs. (50 mL) gelöst. Dem RG wurde *N*-Iodsuccinimid (1.98 mg, 8.80 mmol, 1.3 Äq) zugegeben und 1 h bei rt gerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Es wurde zweimal mit Wasser extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das LM *in vacuo* entfernt. Der rote Feststoff wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 99:1) gereinigt um Base **41** (2.6 g, 86%) als gelben Feststoff zu erhalten.

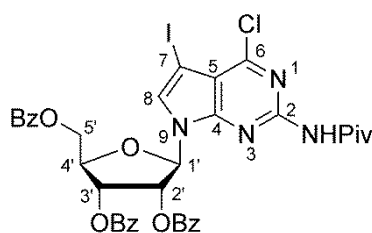
T_{Sm} : 155 – 158 °C; R_f (DCM/MeOH = 10:1): 0.57;

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ =12.35 (s, 1H; CONH), 8.25 (s, 1H; NH), 7.61 (d, $^3J_{\text{HC6,NH}}$ =2.46 Hz, 1H; HC6), 1.39 ppm (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ =176.3 (CO), 152.6 (C6), 152.1 (C2), 150.6 (C4), 134.1 (C7), 113.7 (C8), 110.0 (C5), 40.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.4 ppm (3C; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClIN}_4\text{O}]^+$ 378.9817, gefunden: 378.9822 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.1.5 6-Chlor-7-iod-2-pivaloylamino-9-[(2',3',5'-tri-*O*-benzoyl)- β -D-ribofuranosyl]-9H-7-desazaguanosin (46)



Nukleobase **41** (50 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq) wurde unter Stickstoff in MeCN abs. (1 mL) gelöst und mit *N*-*O*-Bistrimethylsilylacetamid (39 μL , 0.16 mmol, 1.2 Äq) und Trimethylsilyltriflat (33 μL , 0.17 mmol, 1.3 Äq) versetzt. Das Reaktionsgemisch (RG) wurde auf 50 °C erhitzt und Acetyltribenzoylribofuranose (133 mg, 0.26 mmol, 2.0 Äq) in drei Portionen über 24 h zugegeben. Es wurde DCM (9 mL) zugegeben und mit ges. NaHCO_3 und ges. NaCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (*i*Hex/EtOAc = 8:1 \rightarrow 1:1), um Nukleosid **46** (59 mg, 54%) als gelben Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 60 – 61 °C, **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 3:1): 0.30;

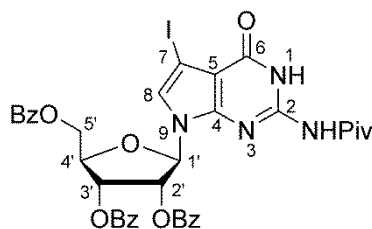
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=8.26 (s, 1H; NCH), 8.01 – 7.95 (m, 6H; ArH), 7.59 – 7.52 (m, 3H; ArH), 7.44 – 7.32 (m, 7H; ArH, HC8), 6.50 – 6.48 (m, 1H; HC3'), 6.41 (d, ³J_{HC1',HC2'}=4.02 Hz, 1H; HC1'), 6.25 (dd, ³J_{HC2',HC1'}=3.96 Hz, ³J_{HC2',HC3'}=5.90 Hz, 1H; HC2'), 4.87 (dd, ³J_{HaC5',HC4'}=3.40 Hz, ³J_{HaC5',HbC5'}=12.24 Hz, 1H; HaC5'), 4.81 – 4.72 (m, 1H; HC4'), 4.69 (dd, ³J_{HbC5',HaC5'}=4.44 Hz, ³J_{HbC5',HC4'}=12.24 Hz, 1H; HbC5'), 1.31 ppm (s, 9H; C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ=175.1 (CO), 166.1 (ArCO), 165.4 (ArCO), 165.2 (ArCO), 153.3 (C4), 151.6 (C6), 151.5 (C2), 133.7 (Ar), 133.5 (Ar), 133.4 (Ar), 129.9 (2C; Ar), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (5C; Ar), 128.6 (2C; Ar), 128.5 (4C; Ar), 114.1 (C8), 98.4 (C5), 88.3 (C1'), 80.1 (C4'), 74.5 (C2'), 71.4 (C3'), 63.4 (C5'), 53.5 (C7), 40.3 (C(CH₃)₃), 27.3 ppm (3C; C(CH₃)₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2963 (w, CH), 1720 (s, NHCO), 1263 (s, C(CH₃)₃), 1094 (s, COC), 707 (s, Ar);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₃₇H₃₃ClIN₄O₈]⁺ 823.1026, gefunden: 823.1027 [M+H]⁺.

7.5.1.6 7-Iod-2-pivaloylamino-9-[(2',3',5'-tri-*O*-benzoyl)-β-D-ribofuranosyl]-9H-7-desazaguanosin (**47**)



Nukleosid **46** (1.01 g, 1.23 mmol, 1.0 Äq) wurde in DMF (1.2 mL) gelöst, mit DABCO (137 mg, 1.23 mmol, 1.0 Äq), NEt₃ (0.51 mL, 3.67 mmol, 3.0 Äq) und Cäsiumacetat (705 mg, 3.67 mmol, 3.0 Äq) versetzt und bei rt für 45 h gerührt. Es wurde Wasser (1.0 mL) zugegeben und weitere 0.5 h gerührt bevor zweimal mit EtOAc extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das LM *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (*i*Hex/EtOAc = 2:1), um Nukleosid **47** (0.56 g, 57%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 92 – 94 °C; **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 1:1): 0.50;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=11.56 (s, 1H; NH), 8.76 (s, 1H; NCH), 7.99 – 7.96 (m, 2H; ArH), 7.91 – 7.88 (m, 2H; ArH), 7.78 – 7.74 (m, 2H; ArH), 7.62 – 7.51 (m, 3H; ArH), 7.46 – 7.31 (m, 6H; ArH), 6.96 (s, 1H; HC8), 6.83 (dd, 1H, ³J_{HC3',HC2'}=4.92 Hz, ³J_{HC3',HC4'}=8.22; HC3'), 6.45 (dd, 1H, ³J_{HC2',HC1'}=1.71 Hz, ³J_{HC2',HC3'}=4.92; HC2'), 6.02 (d, 1H, ³J_{HC1',HC2'}=1.77 Hz; HC1'), 4.79 – 4.61 (m, 3H; HC4', H₂C5'), 1.35 ppm (m, 9H; C(CH₃)₃);

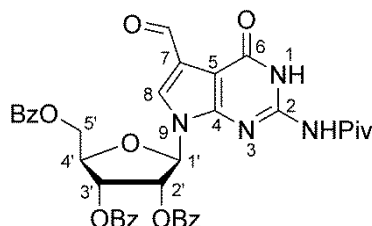
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=180.1 (CO), 166.1 (ArCO), 166.0 (ArCO), 165.1 (ArCO), 156.7 (C4), 146.5 (C6), 146.3 (C2), 133.8 (2C; Ar), 133.5 (Ar), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (2C; Ar), 129.4 (2C; Ar), 129.0 (Ar), 128.8 (Ar), 128.7 (Ar), 128.6 (2C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 127.1

(C8), 106.6 (C5), 89.3 (C1'), 78.5 (C4'), 74.5 (C2'), 70.6 (C3'), 61.5 (C5'), 56.0 (C7), 40.2 (C(CH₃)₃), 26.9 ppm (3C; C(CH₃)₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3227 (w, Ar), 2921 (w, CH), 1660 (s, CHO), 1602 (s, NHCO), 1245 (m, C(CH₃)₃), 1059 (m, COC), 704 (s, Ar);

HRMS (ESI⁻): ber. für: [C₃₇H₃₂IN₄O₉]⁻ 803.1219, gefunden: 803.1210 [M-H]⁻.

7.5.1.7 7-Formyl-2-pivaloylamino-9-[(2,3,5-tri-*O*-benzyl)- β -D-ribofuranosyl]-9H-7-desazaguanosin (**48**)¹¹⁵



Nukleosid **47** (100 mg, 0.12 mmol, 1.00 Äq), Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (11 mg, 0.01 mmol, 0.01 Äq) und Triphenylphosphin (20 mg, 0.08 mmol, 0.60 Äq) wurden in einem Autoklaven in Toluol abs. (4 mL) gelöst. Die Apparatur wurde dreimal mit Kohlenmonoxid gespült und auf 5 bar eingestellt. Tributylzinnhydrid (40 μ L, 0.15 mmol, 1.2 Äq) wurde in Toluol abs. (0.95 mL) gelöst und mit Hilfe einer Spritzenpumpe über 1 h bei 55 °C zugetropft. Das RG wurde weitere 5 h bei 55 °C und 5 bar gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Feststoff säulenchromatographisch gereinigt (*i*Hex/EtOAc = 2:1), um Aldehyd **48** (81 mg, 91%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Sm}: 105 – 107 °C; R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:1): 0.25;

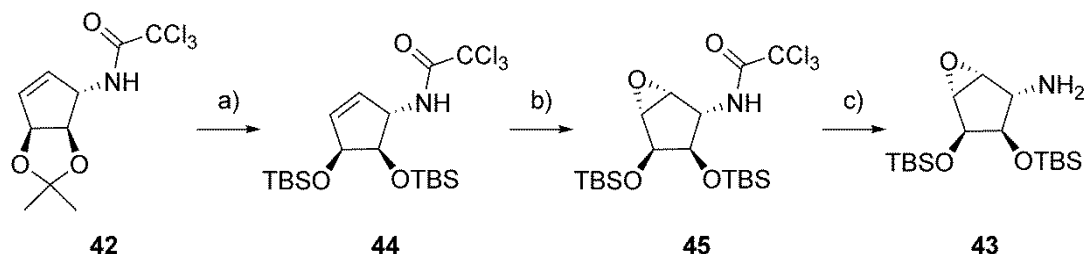
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 10.37 (s, 1H; CHO), 8.84 (s, 1H; NCH), 7.98 (dd, ³J_{ArH,ArH} = 1.20 Hz, ³J_{ArH,ArH} = 8.34 Hz, 2H; ArH), 7.91 (dd, ³J_{ArH,ArH} = 1.26 Hz, ³J_{ArH,ArH} = 8.40 Hz, 2H; ArH), 7.76 (dd, ³J_{ArH,ArH} = 1.26 Hz, ³J_{ArH,ArH} = 8.34 Hz, 2H; ArH), 7.62 – 7.54 (m, ArH, 4H; HC8), 7.46 – 7.32 (m, 6H; ArH), 6.89 (dd, ³J_{HC3',HC2'} = 5.04 Hz, ³J_{HC3',HC4'} = 8.40 Hz, 1H; HC3'), 6.51 (dd, ³J_{HC2',HC1'} = 1.68 Hz, ³J_{HC2',HC3'} = 5.04 Hz, 1H; HC2'), 6.07 (d, ³J_{HC1',HC2'} = 1.68 Hz, 1H; HC1'), 4.83 – 4.80 (m, 1H; HC4'), 4.76 (dd, ³J_{HaC5',HC4'} = 4.92 Hz, ²J_{HaC5',HbC5'} = 12.42 Hz, 1H; HaC5'), 4.67 (dd, ³J_{HbC5',HC4'} = 3.36 Hz, ²J_{HbC5',HaC5'} = 12.54 Hz, 1H; HbC5'), 1.38 ppm (s, 9H; C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 186.1 (CHO), 180.3 (CO), 166.1 (ArCO), 166.0 (ArCO), 165.1 (ArCO), 156.7 (C4), 147.3 (C6), 147.2 (C2), 133.9 (Ar), 133.8 (Ar), 133.6 (Ar), 129.8 (4C; Ar), 129.2 (2C; Ar), 128.9 (Ar), 128.6 (4C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 128.4 (2C; Ar), 126.6 (C8), 121.0 (C7), 104.7 (C5), 90.5 (C1'), 78.8 (C4'), 74.4 (C2'), 70.6 (C3'), 61.4 (C5'), 40.3 (C(CH₃)₃), 26.9 ppm (3C; C(CH₃)₃);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =2962 (w, CH), 1724 (m, CHO), 1663 (m, NHCO), 1601 (m, NHCO), 1262 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1093 (m, COC), 708 (s, Ar);

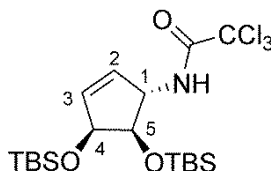
HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{10}]^+$ 707.2348, gefunden: 707.2348 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.2 Synthese von Epoxid **43**^{115,149}



Schema 25: Synthese zum Epoxid. a) i) AcOH (70%), 40 °C, 2 h; ii) TBSCl, Pyridin, rt, 40 h, 77%; b) mCPBA, DCM, 50 °C, 5 h, 88%; c) NaOH (2 M), EtOH, rt, 13 h, 87%.

7.5.2.1 (1*S*,4*R*,5*S*)-1-(*N*-Trichloroacetyl-amino)-4,5-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclopent-2-en-4,5-diol (**44**)



Cyclopenten **42** (0.50 g, 1.66 mmol, 1.0 Äq) wurde in Essigsäure (70%ig, 5 mL) gelöst und bei 40 °C für 20 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, das RG unter Luftausschluss in Pyridin abs. (10 mL) gelöst, mit TBSCl (1.00 g, 6.66 mmol, 4.0 Äq) versetzt und bei 40 °C für 20 h gerührt. Dem RG wurde weiteres TBSCl (502 mg, 3.33 mmol, 2.0 Äq) hinzugegeben und zusätzliche 20 h bei 40 °C gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und mit ges. NH_4Cl gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (*i*Hex/EtOAc = 10:1), um Cyclopenten **44** (0.63 g, 77%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 152 – 154 °C; **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 10:1): 0.42;

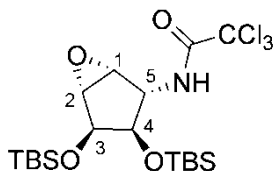
¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =6.61 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{HC1}}$ =7.8 Hz; NH), 6.02 – 5.99 (m, 1H; HC1), 5.87 – 5.85 (m, 1H; HC2), 4.88 – 4.84 (m, 1H; HC3), 4.51 – 4.48 (m, 1H; HC5), 3.99 – 3.95 (m, 1H; HC4), 0.90 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.89 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.10 (s, 3H; CH_3), 0.09 (s, 3H; CH_3), 0.08 (s, 3H; CH_3), 0.06 ppm (s, 3H; CH_3);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =161.7 (CO), 135.2 (C1), 133.3 (C2), 92.6 (CCl_3), 78.5 (C5), 74.2 (C4), 61.8 (C3), 25.9 (3C; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.8 (3C; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.2 (2C; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -4.1 (CH_3), -4.3 (CH_3), -4.4 (CH_3), -4.9 ppm (CH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3292 (w, CONH), 2952 (m, CH), 2928 (m, CH), 2856 (m, CH), 1689 (m, NHCO), 1528 (m, NHCO), 1249 (m, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1150 (m, $\text{C}(\text{CH}_2)_2$), 834 (s, $\text{C}=\text{C}$);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{Cl}_3\text{NNaO}_3\text{Si}_2]^+$ 510.1192, gefunden: 510.1194 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.2.2 (1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-*N*-trichloracetyl-amino-1,2-epoxycyclopentan-3,4-diol (**45**)



Cyclopenten **44** (350 mg, 0.72 mmol, 1.0 Äq) wurde in DCM (23 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dem RG wurde mCPBA (247 mg, 1.43 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und 0.5 h bei 0 °C gerührt. Bei rt wurde für weitere 50 h gerührt, um dann für 5 h auf 50 °C zu erhitzen. Es wurde ges. NaHCO_3 zu der abgekühlten Suspension zugegeben und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*Hex/EtOAc = 20:1) gereinigt, um Epoxid **45** (318 mg, 88%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 92 – 94 °C; **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 10:1): 0.41;

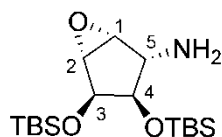
¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 6.78 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{HC1}}$ = 6.33 Hz; NH), 4.42 – 4.38 (m, 1H; HC5), 4.17 (d, $^3J_{\text{HC3},\text{HC4}}$ = 3.45 Hz, 1H; HC3), 3.77 (dd, $^3J_{\text{HC4},\text{HC3}}$ = 3.45 Hz, $^3J_{\text{HC4},\text{HC5}}$ = 5.67 Hz, 1H; HC4), 3.64 – 3.63 (m, 1H; C1H), 3.46 – 3.45 (m, 1H; C2H), 0.92 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.87 (s, 9H; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.13 (s, 3H; CH_3), 0.11 (s, 3H; CH_3), 0.05 (s, 3H; CH_3), 0.04 ppm (s, 3H; CH_3);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 162.2 (CO), 92.3 (CCl_3), 74.7 (C4), 70.2 (C3), 57.9 (C5), 56.3 (C2), 56.0 (C1), 25.7 (6C; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 17.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -4.2 (CH_3), -4.4 (CH_3), -4.6 (CH_3), -4.9 ppm (CH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3327 (w, CONH), 2930 (w, CH), 1719 (m, CONH), 1256 (m, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 832 (s, C1OC2);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{Cl}_3\text{NNaO}_4\text{Si}_2]^+$ 526.1141, gefunden: 526.1142 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

7.5.2.3 (1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-Amino-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1,2-epoxycyclopentan-3,4-diol **43**



Epoxid **45** (31 mg, 0.06 mmol) wurde in EtOH (2 mL) gelöst und mit wässriger Natronlauge (2 M, 0.5 mL) versetzt. Das RG wurde bei rt für 13 h gerührt, dann mit ges. NaHCO₃ (1 mL) versetzt und weitere 0.5 h bei rt gerührt. Darauf wurde das RG dreimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 20:1) und es wurde Epoxid **43** (19 mg, 87%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (DCM/MeOH = 10:1): 0.20;

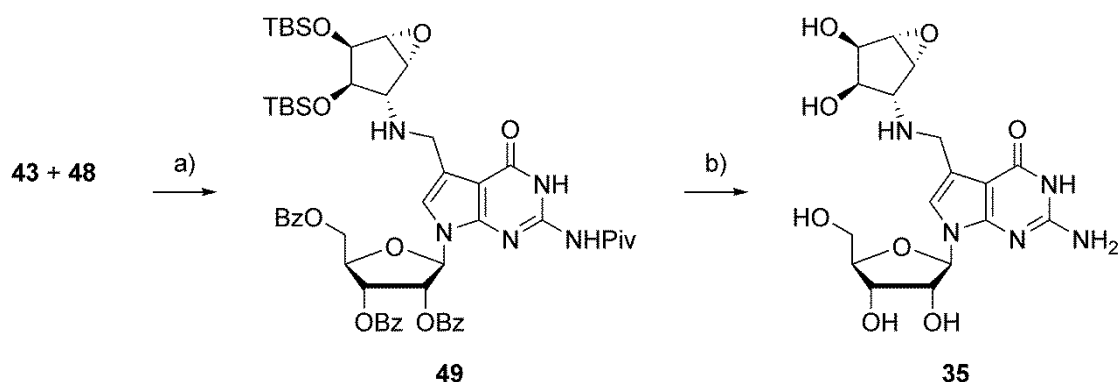
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=4.12 (d, ³J_{HC3,HC4}=4.62 Hz, 1H; HC3), 3.46 (dd, ³J_{HC4,HC3}=4.62 Hz, ³J_{HC4,HC5}=7.26 Hz, 1H; HC4), 3.43 (m, 1H; HC1), 3.33 (m, 1H; HC2), 3.23 (d, ³J_{HC5,HC4}=7.26 Hz, 1H; HC5), 1.65 (s, 2H; NH₂), 0.90 (s, 9H; C(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H; C(CH₃)₃), 0.10 (s, 3H; CH₃), 0.08 (s, 6H; CH₃), 0.05 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ=78.3 (C4), 71.1 (C3), 58.6 (C5), 57.7 (C2), 55.7 (C1), 26.0 (3C; C(CH₃)₃), 25.8 (3C; C(CH₃)₃), 18.1 (2C; C(CH₃)₃), -4.1 (CH₃), -4.3 (CH₃), -4.5 ppm (2C; CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3034 (w, C1OC2), 2929 (w, CH), 1253 (m, C(CH₃)₃), 1146 (m, NH₂), 831 (s, C1OC2);

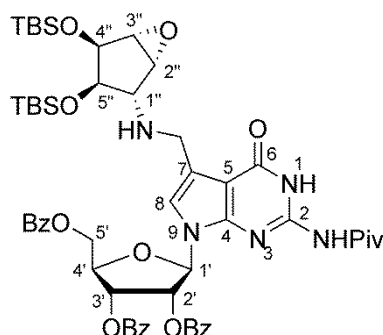
HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₁₇H₃₈NO₃Si₂]⁺ 360.2385, gefunden: 360.2384 [M+H]⁺.

7.5.3 Synthese von Epoxyqueuosin (oQ, 35)¹¹⁵



Schema 26: Synthese des Epoxyqueuosins (oQ). a) i) Benzol, 50 °C, 5 h; ii) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 1 h, 73%; b) i) NaOH (0.5 m in MeOH), rt, 24 h; ii) 3HF·NEt₃, rt, 23 h, 66%.

7.5.3.1 7-[(1''R,2''S,3''R,4''S,5''R)-5''-Amino-methyl-3'',4''-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1,2-epoxy]-2-pivaloylamino-9-[(2',3',5'-tri-*O*-benzoyl)-β-D-ribofuranosyl]-9H-7-desazaguanosin (49)



Unter Luftausschluss wurden Aldehyd **48** (100 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq) und Epoxid **43** (61 mg, 0.17 mmol, 1.2 Äq) in Benzol abs. (7 mL) gelöst. Das RG wurde 5 h auf 50 °C erhitzt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt und in MeOH abs. (3 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde Natriumborhydrid (18 mg, 0.47 mmol, 3.3 Äq) zugegeben und für 1 h bei 0 °C gerührt. Es wurde Wasser (10 mL) zugegeben und 0.5 h bei 25 °C weitergerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 100:1) um Nukleosid **49** (109 mg, 73%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 83 – 85 °C, R_f (DCM/MeOH = 10:1): 0.57;

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=8.73 (s, 1H; NCH), 7.99 – 7.98 (m, 2H; ArH), 7.90 – 7.89 (m, 2H; ArH), 7.79 – 7.78 (m, 2H; ArH), 7.60 – 7.52 (m, 3H; ArH), 7.44 – 7.42 (m, 2H; ArH), 7.38 – 7.33 (m, 4H; ArH), 6.91 (dd, ³J_{HC3',HC2'}=4.90 Hz, ³J_{HC3',HC4'}=8.10 Hz, 1H; HC3'), 6.82 (s, 1H; HC8), 6.49 (dd, ³J_{HC2',HC1'}=1.80 Hz, ³J_{HC2',HC3'}=4.90 Hz, 1H; HC2'), 6.02 (d, ³J_{HC1',HC2'}=1.80 Hz, 1H; HC1'), 4.78 – 4.70 (m, 2H; HaC5', HC4'), 4.63 (dd, ³J_{HbC5',HC4'}=3.24 Hz, ²J_{HbC5',HaC5'}=12.30 Hz, 1H; HbC5'), 4.12 – 4.13 (m, 1H; HC1''), 4.02 (s, 2H; CH₂), 3.45 (dd, ³J_{HC5'',HC1''}=4.68 Hz, ³J_{HC5'',HC4''}=7.20 Hz, 1H; HC5''), 3.42 (dd, ³J_{HC3'',HC4''}=0.84 Hz, ³J_{HC3'',HC2''}=3.18 Hz, 1H; HC3''),

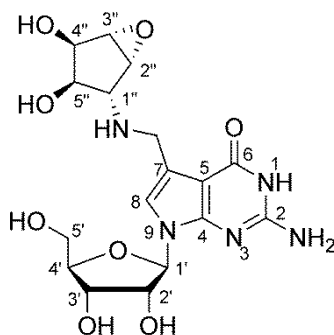
3.33 (dd, $^3J_{\text{HC2}''',\text{HC1}'''}=1.02$ Hz, $^3J_{\text{HC2}''',\text{HC3}'''}=3.12$ Hz, 1H; HC2'''), 3.23 (dd, $^3J_{\text{HC4}''',\text{HC3}'''}=1.20$ Hz, $^3J_{\text{HC4}''',\text{HC5}'''}=7.14$ Hz, 1H; HC4'''), 1.36 (s, 9H; C(CH₃)₃), 0.89 (s, 18H; C(CH₃)₃), 0.11 (s, 3H; CH₃), 0.10 (s, 3H; CH₃), 0.08 (s, 3H; CH₃), 0.05 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ =180.0 (CO), 166.1 (ArCO), 165.9 (ArCO), 165.1 (ArCO), 158.1 (C4), 146.8 (C6), 146.2 (C2), 133.7 (Ar), 133.6 (Ar), 133.5 (Ar), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (2C; Ar), 129.3 (2C; Ar), 129.1 (Ar), 128.9 (Ar), 128.8 (Ar), 128.6 (2C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 128.4 (2C; Ar), 119.5 (C8), 105.1 (C5), 89.4 (C1'), 78.4 (C4'), 74.6 (C2'), 71.1 (C5''), 70.9 (C3'), 70.7 (C1''), 63.1 (C5'), 57.7 (C4''), 56.2 (C2''), 55.7 (C3''), 40.8 (CH₂), 40.2 (C(CH₃)₃), 26.0 (6C; C(CH₃)₃), 25.9 (3C; C(CH₃)₃), 18.1 (2C; C(CH₃)₃), -4.3 (CH₃), -4.4 (CH₃), -4.5 ppm (2C; CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =2955 (w, CH), 2929 (m, CH), 2856 (w, CHO), 1728 (s, COOR), 1665 (CONH), 1609 (CONH), 1256 (s, C(CH₃)₃), 835 (s, C1OC2), 710 (s, Ar);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₅₅H₇₂N₅O₁₂Si₂]⁺ 1050.4711, gefunden: 1050.4715 [M+H]⁺.

7.5.3.2 2-Amino-7-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-1''-amino-methyl-4'',5''-bis-hydroxy-2'',3''-epoxy-cyclopentan]-9- β -D-ribofuranosyl-9*H*-7-desazaguanosin, Epoxyqueuosin (**35**)



Nukleosid **49** (93 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq) wurde in methanolischer Natriumhydroxidlösung (0.5 M, 9 mL) gelöst und bei rt für 24 h gerührt. Die Suspension wurde in DCM aufgenommen und mit ges. NaHCO₃ und ges. NaCl gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit DCM reextrahiert um die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ zu trocknen, filtern und *in vacuo* entfernen. Das Rohprodukt wurde in ein Plastik Gefäß überführt, in trockenem DCM (0.6 mL) gelöst, mit Triethylamine trihydrofluorid (0.06 mL, 0.36 mmol, 4.0 Äq) versetzt und bei rt für 23 h gerührt. Dem RG wurde Methyltrimethoxysilan (1 mL) zugegeben und bei rt weitere 0.5 h gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels HPL Chromatographie gereinigt um oQ **35** (25 mg, 66%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Zer}: 171 °C;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ =8.32 (s, 1H; NH), 6.84 (s, 1H; HC8), 6.4 (s, 2H; NH₂), 5.84 (d, ³J_{H1',H2'}=6.36 Hz, 1H; HC1'), 4.20 (dd, ³J_{H2',H1'}=6.24, ³J_{H2',H3'}=5.36, 1H; HC2'), 4.00 (dd, ³J_{H3',H2'}=5.16 Hz, ³J_{H3',H4'}=3.40 Hz, 1H; HC3'), 3.89 (d, ³J_{H4',H5''}=5.36 Hz, 1H; HC4'), 3.86 (d, ³J_{NH,H1''}=2.24, 2H; CH₂), 3.78 (dd, ³J_{H4',H3'}=4.16 Hz, ³J_{H4',H5'}=7.60 Hz, 1H; HC4'), 3.55 (dd, ³J_{H5a',H4'}=4.28 Hz, ³J_{H5a',H5b'}=11.88 Hz, 1H; HC5a'), 3.49 (dd, ³J_{H5b',H4'}=4.48 Hz, ³J_{H5b',H5a'}=11.80 Hz, 1H; HC5b'), 3.43 (d, ³J_{H2'',H3''}=0.88 Hz, ³J_{H2'',H1''}=2.92 Hz, 1H; C2''H), 3.39 (dd, ³J_{H5'',H4''}=5.28 Hz, ³J_{H5'',H1''}=7.12 Hz, 1H; HC5''), 3.34 (dd, ³J_{H3'',H2''}=0.76 Hz, ³J_{H3'',H1''}=3.00 Hz, 1H; HC3''), 2.99 ppm (dd, ³J_{H1'',NH}=1.04 Hz, ³J_{H1'',H5''}=7.08 Hz, 1H; HC1'');

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ =169.7 (C6), 153.2 (C2), 152.2 (C4), 117.9 (C7), 115.0 (C8), 99.4 (C5), 86.1 (C1'), 84.9 (C4'), 74.7 (C5''), 73.8 (C2'), 70.9 (C3'), 68.2 (C4''), 63.0 (C1''), 62.2 (C5'), 56.3 (C2''), 55.8 (C3''), 44.1 ppm (CH₂);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3333 (m, OH), 2936 (w, CH), 1640 (s, CONH), 1444 (m, CH₂), 1101 (s, br, OH), 1054 (m, CH₂OH) und 863 (m, C2OC3);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₁₇H₂₄N₅O₈]⁺ 426.1619, gefunden: 426.1615 [M+H]⁺;

HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer A, 0% HPLC Puffer B → 80% HPLC Puffer A, 20% HPLC Puffer B in 45 min; Retentionzeit = 24.8 min; Fluss 5 mL/min; Säule: VP 250/4 Nucleosil 120-5 C18.

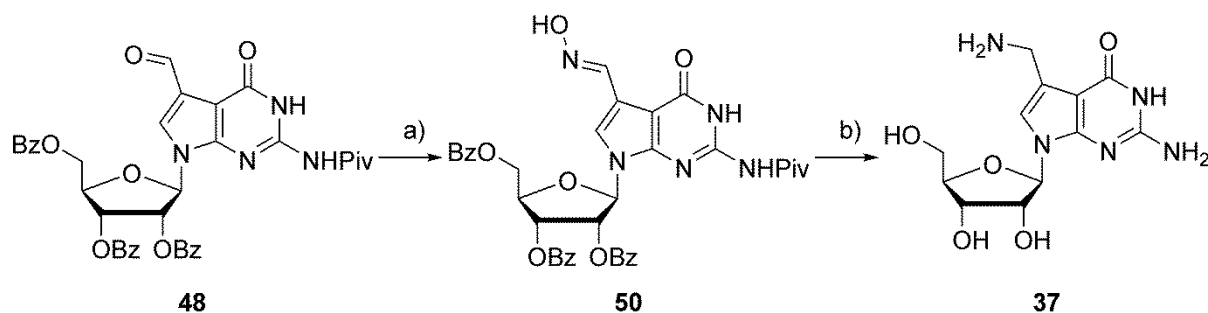
Acetatsalz von oQ:

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ =7.18 (s, 1H; HC6), 6.00 (d, ³J_{H1',H2'}=6.44 Hz, 1H; HC1'), 4.62 (dd, ³J_{H2',H1'}=6.43, ³J_{H2',H3'}=5.02 Hz, 1H; HC2'), 4.50 (s, 2H; CH₂), 4.37 (dd, ³J_{H3',H2'}=5.00 Hz, ³J_{H3',H4'}=3.64 Hz, 1H; HC3'), 4.34 (d, ³J_{H4',H5''}=5.20 Hz, 1H; HC4'), 4.20 (dd, ³J_{H4',H3'}=3.44 Hz, ³J_{H4',H5'}=6.96 Hz, 1H; HC4'), 4.03 (ddd, ³J_{H1'',H5''}=0.68 Hz, ³J_{H1'',H2''}=5.96 Hz, ³J_{H1'',NH2}=7.24 Hz, 1H; C3'H), 3.91 – 3.79 (m, 4H; H₂C5', HC2'', HC5''), 3.73 (d, ³J_{H3'',H2''}=7.32 Hz, 1H; HC3), 1.91 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ =181.3 (CO), 161.4 (C6), 153.2 (C2), 152.2 (C4), 118.8 (C7), 110.0 (C8), 99.4 (C5), 86.7 (C1'), 84.8 (C4'), 73.4 (C2'), 71.9 (C1''), 70.4 (C3'), 68.2 (C4''), 62.6 (C5''), 61.4 (C5'), 56.5 (C3''), 54.0 (C2''), 42.6 (CH₂), 23.2 ppm (CH₃);

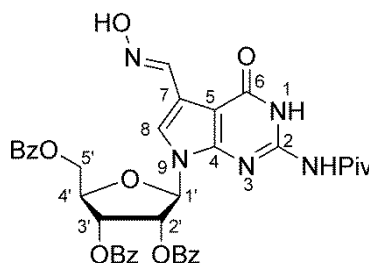
HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D → 90% HPLC Puffer C, 10% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionszeit = 10.5 min; Fluss: 5 mL/min; Säule: VP 250/4 Nucleosil 120-5 C18.

7.5.4 Synthese von preQ1 (**37**)¹⁴⁵



Schema 27: Synthese von preQ1 **37**. a) ClH_4NO , NaHCO_3 , H_2O , rt \rightarrow -20°C , 16 h, 65%; b) $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , MeOH , 0°C , 1 h, 61%.

7.5.4.1 7-Hydroxylaminomethyl-2-pivaloylamino-9-[(2',3',5'-tri-*O*-benzyl)-β-D-ribofuranosyl]-9H-7-desazaguanosin, (**50**)



Hydroxylaminhydrochlorid (14 mg, 0.19 mmol, 1 Äq) wurde portionsweise zu einer Lösung aus NaHCO_3 (16 mg, 0.19 mmol, 1 Äq) in H_2O (3 mL) zugeben. Diese Lösung wurde zu einer stark rührenden Lösung aus Aldehyd **48** (135 mg, 0.19 mmol, 1 Äq) in EtOH (3 mL) zutropfen und für vier Stunden bei rt rühren. Das RG wurde für 12 h auf -20°C gestellt und anschließend dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 100:1) gereinigt um Oxim **50** (91 mg, 65%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$R_f = 0.58$ (DCM/MeOH 10/1);

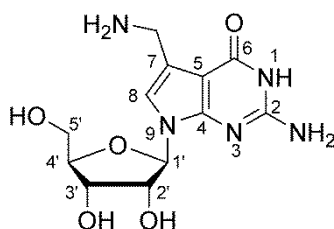
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=11.72$ (s, 1H; NHPiv), 8.85 (s, 1H; NArH), 8.27 (s, 1H; C=NH), 8.04 (s, 1H; HC8), 7.98 (dd, $^4J_{\text{HCortho,HCpara}}=1.16$ Hz, $^3J_{\text{HCortho,HCmeta}}=8.20$ Hz, 2H; HCortho), 7.90 (dd, $^4J_{\text{HCortho,HCpara}}=1.20$ Hz, $^3J_{\text{HCortho,HCmeta}}=8.24$ Hz, 2H; HCortho), 7.78 (dd, $^4J_{\text{HCortho,HCpara}}=1.16$ Hz, $^3J_{\text{HCortho,HCmeta}}=8.12$ Hz, 2H; HCortho), 7.57 (m, 3H; HCpara), 7.38 (m, 6H; HCmeta), 6.88 (dd, $^3J_{\text{HC3'},\text{HC2'}}=5.00$ Hz, $^3J_{\text{HC3'},\text{HC4'}}=7.92$ Hz, 1H; HC3'), 6.51 (dd, $^3J_{\text{HC2'},\text{HC1'}}=1.92$ Hz, $^3J_{\text{HC2'},\text{HC3'}}=4.88$ Hz, 1H; HC2'), 6.12 (d, $^3J_{\text{HC1'},\text{HC2'}}=2.08$ Hz, 1H; HC1'), 4.78 (m, 1H; HC4'), 4.74 (dd, $^3J_{\text{HaC5'},\text{HC4'}}=3.16$ Hz, $^2J_{\text{HaC5'},\text{HbC5'}}=12.44$ Hz, 1H; HaC5'), 4.66 (dd, $^3J_{\text{HbC5'},\text{HC4'}}=3.26$ Hz, $^2J_{\text{HbC5'},\text{HaC5'}}=12.32$ Hz, 1H; HbC5'), 1.37 ppm (s, 9H; $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$);

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ =180.2 ($\text{C}=\text{O}$), 166.1 (PhCO), 165.9 (PhCO), 165.1 (PhCO), 157.3 (C6), 146.8 (C2), 146.0 (C4), 139.5 (HC=NH), 133.7 (Ar), 133.7 (Ar), 133.5 (Ar), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (2C; Ar), 129.3 (2C; Ar), 129.0 (Ar), 128.7 (Ar), 128.7 (Ar), 128.6 (2C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 128.4 (2C; Ar), 126.5 (C8), 110.1 (C7), 104.0 (C5), 89.6 (C1'), 78.6 (C4'), 74.4 (C2'), 70.7 (C3'), 61.7 (C5'), 40.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.9 ppm (3C; $\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =3227 (w, OH), 2361 (m, C=N), 1725 (s, CO), 1669 (s, C=N), 1601 (s, Ar), 1263 (s, CH), 709 (s, Ar);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_{10}]^+$ 722.2457, gefunden: 722.2460 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.4.2 2-Amino-7-aminomethyl-9-(β -D-ribofuranosyl)-9H-7-desazaguanosin, preQ1 (37)



Zu einer Lösung aus Nickel(II)-chlorid Hexahydrat (14 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (1 mL) wurde eine Lösung aus **50** (42 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (1.5 mL) zugegeben. Das RG wurde auf 0 °C gekühlt und mit Natriumborhydrid (14 mg, 0.37 mmol, 6.4 Äq) versetzt. Nach einer Stunde wurde das RG mit NH_3 (2 N in H_2O 5 mL) versetzt. Darauf wurde zweimal mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das LM *in vacuo* eingengt. Der Feststoff wurde in methanolischer Natronlauge (0.5 M, 4 mL) aufgenommen und 12 h bei rt gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt um preQ1 (8 mg, 61%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{sm}: 149 – 151 °C;

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 7.08 (s, 1H; HC8), 5.92 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=5.84$ Hz, 1H; HC1'), 4.43 (dd, $^3J_{\text{HC2}',\text{HC3}'}=5.60$ Hz, $^3J_{\text{HC2}',\text{HC1}'}=5.80$ Hz, 1H; HC2'), 4.23 (dd, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC4}'}=3.52$ Hz, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC2}'}=5.40$ Hz, 1H; HC3'), 4.13 (d, $^4J_{\text{H2C},\text{HC6}}=0.84$ Hz, 2H; CH₂), 4.03 (dd, $^3J_{\text{HC4}',\text{HC3}'}=3.32$ Hz, $^3J_{\text{HC4}',\text{HC5}'}=6.64$ Hz, 1H; HC4'), 3.80 (dd, $^3J_{\text{HaC5}',\text{HC4}'}=3.12$ Hz, $^2J_{\text{HaC5}',\text{HbC5}'}=12.28$ Hz, 1H; HaC5'), 3.72 ppm (dd, $^3J_{\text{HbC5}',\text{HC4}'}=3.52$ Hz, $^2J_{\text{HbC5}',\text{HaC5}'}=12.04$ Hz, 1H; HbC5');

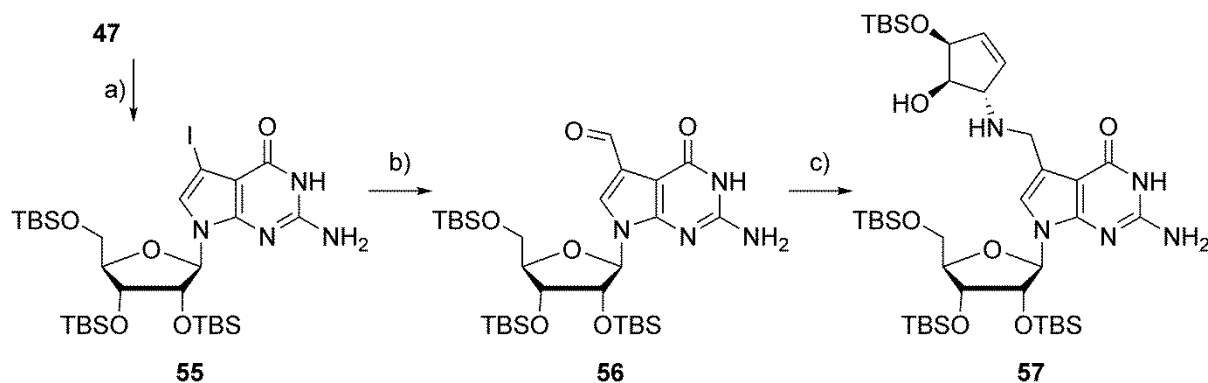
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ = 160.9 (C6), 153.1 (C2), 152.2 (C7), 117.8 (C8), 110.9 (C4), 99.2 (C4), 88.3 (C1'), 85.2 (C4'), 74.3 (C2'), 70.8 (C3'), 61.8 (C5'), 35.7 ppm (CH₂);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =3113 (m, OH), 1687 (m, CO), 1614 (s, NH), 1553 (s, NH), 1403 (s, OH), 1077 (s, CO), 1024 (s, CO);

HRMS (ESI-) for $[\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_5]^-$: ber.: 310.1157, gefunden: 310.1154 $[\text{M} - \text{H}]^-$;

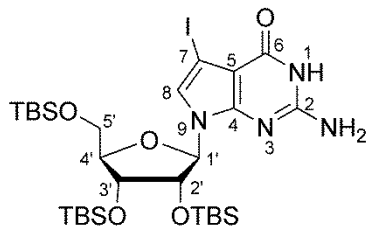
HPLC: Gradient: 100% HPLC Puffer C, 0% HPLC Puffer D → 90% HPLC Puffer C, 10% HPLC Puffer D in 45 min; Retentionzeit = 10.4 min; Fluss 5 mL/min; Säule: VP 250/10 Nucleosil 100-5 C18.

7.5.5 Synthese zu Glutamyl-Queuosin (36)



Schema 28: Synthese zu Glutamyl-Queuosin. a) i) NH_3 (1 N), 40 °C, 24 h; ii) TBSCl, Imidazol, DMF, 40 °C, 24 h, 60%; b) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $\text{P}(\text{Ph}_3)_3$, Bu_3SnH , CO, Toluol, 55 °C, 5 h, 5 bar, 57%; c) i) Benzol, 45 °C, 6 h; ii) NaBH_4 , MeOH, 0 °C, 1 h, 49%.

7.5.5.1 2-Amino-7-iod-9-[(2',3',5'-tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyloxy)- β -D-ribofuranosyl]-9H-7-desazaguanosin (55)



Nukleosid **47** (100 mg, 0.12 mmol, 1 Äq) wurde in einem Druckrohr in Ammoniak (1 N, 4 mL) gelöst und bei 40 °C für 24 h gerührt. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst, in einen Kolben überführt, *in vacuo* eingengt, in DMF (1 mL) gelöst und mit TBSCl (94 mg, 0.62 mmol, 5 Äq) und Imidazol (42 mg, 0.62 mmol, 5 Äq) versetzt. Bei 40 °C wurde das RG für 24 h gerührt bevor es in DCM aufgenommen und gegen ges. NaHCO_3 und ges. NaCl extrahiert wurde. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch ($\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{NEt}_3 = 20:1:0.1$) gereinigt um **55** als farblosen Feststoff zu erhalten. (56 mg, 60%)

R_f ($\text{DCM}/\text{MeOH} = 10:1$): 0.24;

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta=7.12$ (s, 1H; HC8), 6.01 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=5.46$ Hz, 1H; HC1'), 4.26 (dd, $^3J_{\text{HC2}',\text{HC3}'}=4.80$ Hz, $^3J_{\text{HC2}',\text{HC1}'}=5.10$ Hz, 1H; HC2'), 4.19 (dd, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC4}'}=3.24$ Hz, $^3J_{\text{HC3}',\text{HC2}'}=4.38$ Hz, 1H; HC3'), 4.03 (dd, $^3J_{\text{HC4}',\text{HC3}'}=2.70$ Hz, $^3J_{\text{HC4}',\text{HC5}'}=5.40$ Hz, 1H; HC4'), 3.90 (dd, $^3J_{\text{HaC5}',\text{HC3}'}=3.12$ Hz, $^3J_{\text{HaC5}',\text{HbC5}'}=11.46$ Hz, 1H; HaC5'), 3.74 (dd, $^3J_{\text{HbC5}',\text{HC4}'}=2.22$ Hz, $^3J_{\text{HbC5}',\text{HaC5}'}=11.52$ Hz, 1H; HbC5'), 0.97 (s, 9H; $(\text{CH}_3)_3$), 0.92 (s, 9H; $(\text{CH}_3)_3$), 0.81 (s, 9H; $(\text{CH}_3)_3$),

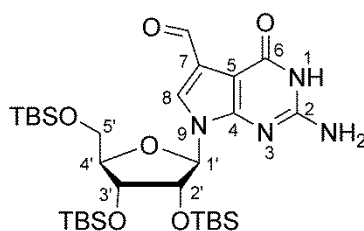
0.16 (s, 3H; SiCH₃), 0.15 (s, 3H; SiCH₃), 0.14 (s, 3H; SiCH₃), 0.09 (s, 6H; SiCH₃), -0.05 (s, 3H; SiCH₃), -0.19 ppm (s, 3H; SiCH₃);

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ=160.1 (C6), 152.2 (C2), 151.8 (C4), 123.1 (C8), 100.8 (C5), 100.7 (C7), 87.1 (C1'), 85.2 (C4'), 79.7 (C2'), 72.3 (C3'), 62.9 (C5'), 26.2 (3C; (CH₃)₃), 25.9 (3C; (CH₃)₃), 25.7 (3C; (CH₃)₃), 18.6 (C(CH₃)₃), 18.1 (C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.4 (SiCH₃), -4.7 (2C; SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -5.4 ppm (SiCH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3324 (w, NH), 2925 (w, CH), 1672 (m, CONH).

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₂₉H₅₆IN₄O₅Si₃]⁺ 751.2598, gefunden: 751.2598 [M+H]⁺.

7.5.5.2 2-Amino-7-formyl-9-[(2',3',5'-tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyloxy)-β-D-ribofuranosyl]-9*H*-7-desazaguanosin IT124 (**56**)



Unter Luftausschluss wurden Nukleosid **55** (61 mg, 0.08 mmol, 1.00 Äq), Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (7 mg, 0.01 mmol, 0.01 Äq) und Triphenylphosphin (11 mg, 0.04 mmol, 0.60 Äq) in Toluol abs. (1.50 mL) gelöst. Die Apparatur wurde dreimal mit Kohlenmonoxid gespült. Tributylzinnhydrid (20 µL, 0.09 mmol, 1.20 Äq) wurde in Toluol abs. (0.97 mL) gelöst und mit Hilfe einer Spritzenpumpe über 1 h bei 55 °C zugetropft. Das RG wurde weitere 5 h bei 55 °C gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Feststoff säulenchromatographisch gereinigt (*i*Hex/EtOAc = 2:1), um Aldehyd **56** als farblosen Feststoff zu erhalten. (57%)

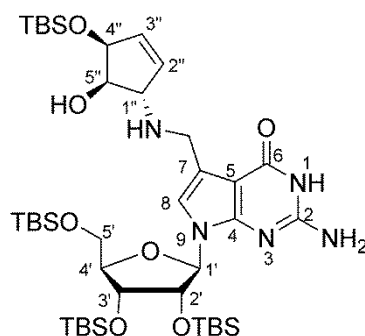
R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:2): 0.08;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=10.97 (s, 1H; NH), 9.73 (s, 1H; CHO), 7.85 (s, 1H; HC8), 6.06 (d, ³J_{HC1',HC2'}=4.12 Hz, 1H; HC1'), 4.28 (dd, ³J_{HC2',HC3'}=4.20 Hz, ³J_{HC2',HC1'}=4.20 Hz, 1H; HC2'), 4.22 (dd, ³J_{HC3',HC2'}=4.28 Hz, ³J_{HC3',HC4'}=4.52 Hz, 1H; HC3'), 4.12 – 4.10 (m, 1H; HC4'), 4.02 (dd, ³J_{HaC5',HC3'}=2.76 Hz, ³J_{HaC5',HbC5'}=11.56 Hz, 1H; HaC5'), 3.81 (dd, ³J_{HbC5',HC4'}=2.04 Hz, ³J_{HbC5',HaC5'}=11.56 Hz, 1H; HbC5'), 0.98 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.93 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.87 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.17 (s, 3H; SiCH₃), 0.16 (s, 3H; SiCH₃), 0.09 (s, 6H; SiCH₃), 0.02 (s, 3H; SiCH₃), -0.04 ppm (s, 3H; SiCH₃);

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ =183.5 (CO), 159.6 (C6), 154.8 (C2), 154.1 (C4), 132.1 (C8), 121.2 (C7), 97.0 (C5), 88.0 (C1'), 84.6 (C4'), 77.2 (C2'), 71.4 (C3'), 62.3 (C5'), 26.1 (3C; (CH₃)₃), 25.8 (3C; (CH₃)₃), 25.7 (3C; (CH₃)₃), 18.6 (C(CH₃)₃), 18.1 (C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.3 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), -4.8 (2C; SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.4 ppm (SiCH₃);

HRMS (ESI+): ber. für: [C₃₀H₅₇N₄O₆Si₃]⁺ 653.3580, gefunden: 653.3588 [M+H]⁺.

7.5.5.3 2-Amino-7-[(3*S*,4*R*,5*S*)-1''-amino-methyl-4''-*O*-*tert*-butyldimethylsilyloxy-5''-hydroxy-cyclopenten]-9-[(2',3',5'-tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyloxy)- β -D-ribofuranosyl]-9*H*-7-desazaguanosin (**57**)



Unter Luftausschluss wurden Nukleosid **56** (25 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq) und Cyclopenten **52** (10 mg, 0.05 mmol, 1.2 Äq) in Benzol abs. (1 ml) gelöst. Das RG wurde bei 45 °C für 6 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt und in MeOH abs. (1 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde Natriumborhydrid (4 mg, 0.11 mmol, 3 Äq) zugegeben und für 1 h bei 0 °C gerührt. Es wurde Wasser (3 mL) zugegeben und 0.5 h bei 25 °C weitergerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH = 100:1→20:1), um Nukleosid **57** als farblosen Feststoff zu erhalten. (16 mg, 49%)

R_f (DCM/MeOH = 10:1): 0.33;

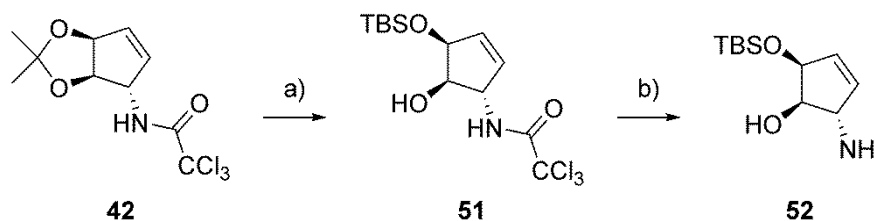
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ =6.97 (s, 1H; HC8), 6.01 (d, ³J_{HC1',HC2''}=5.64 Hz, 1H; HC1'), 5.99 (m, 2H; HC2'', HC3''), 4.83 (s, 1H; HC1''), 4.26 – 4.26 (m, 1H; HC4''), 4.20 – 4.18 (m, 4H; CH₂, HC5'', HC2'), 4.04 (dd, ³J_{HC4',HC5'}=3.00 Hz, ³J_{HC4',HC3'}=5.88 Hz, 1H; HC4'), 3.96 (s, 1H; HC3'), 3.88 (dd, ³J_{HaC5',HC4'}=3.30 Hz, ³J_{HaC5',HbC5'}=11.40 Hz, 1H; HaC5'), 2.50 (dd, ³J_{HbC5',HC4'}=2.64 Hz, ³J_{HbC5',HaC5'}=11.40 Hz, 1H; HbC5'), 0.96 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.93 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.89 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.80 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.15 (s, 3H; CH₃), 0.13 (s, 3H; CH₃), 0.12 (s, 3H; CH₃), 0.10 (s, 6H; CH₃), 0.09 (s, 3H; CH₃), -0.07 (s, 3H; CH₃), -0.26 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ =161.1 (C6), 152.4 (C2), 152.2 (C4), 138.7 (C3''), 131.8 (C2''), 117.8 (C8), 116.6 (C7), 99.6 (C5), 87.0 (C1'), 85.2 (C4'), 78.6 (C4''), 76.4 (C5''/C2'), 74.7 (C1''), 72.0 (C2'/C5''), 67.5 (C3'), 63.0 (C5'), 43.3 (CH₂), 26.1 (3C; C(CH₃)₃), 25.9 (3C; C(CH₃)₃), 25.8 (3C; C(CH₃)₃), 25.7 (3C; C(CH₃)₃), 18.5 (C(CH₃)₃), 18.1 (2C; C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.4 (2C; CH₃), -4.7 (CH₃), -4.8 (CH₃), -4.9 (CH₃), -5.2 (CH₃), -5.3 (CH₃), -5.4 ppm (CH₃);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 2929 (w, CH), 1627 (m, CONH), 1251 (s, Si(CH₃)₂), 2080 (m, COC) und 832 (s, Si(CH₃));

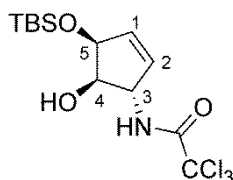
HRMS (ESI+): ber. für: [C₄₁H₈₀N₅O₇Si₄]⁺ 866.5129, gefunden: 866.5123 [M+H]⁺.

7.5.6 Synthese von Cyclopenten **52**



Schema 29: Synthese von Cyclopenten **52**. a) i) AcOH (70%), 40 °C, 20 h; ii) TBSCl, Pyridin, 35 °C, 20 h; 64%; b) NH₃ (7 N und konz.), rt, 25 h; 50%.

7.5.6.1 (3*S*,4*R*,5*S*)-4-Hydroxy-5-*O*-*tert*-butyldimethylsilyloxy-3-trichloracetamidcyclopenten (**51**)¹⁵⁵



Cyclopenten **42** (500 mg, 1.66 mmol, 1.0 Äq) wurde in Essigsäure (70%ig, 5 mL) gelöst und bei 40 °C für 20 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt, das Rohprodukt in Pyridin (10 mL) gelöst und mit TBSCl (301 mg, 2.00 mmol, 1.2 Äq) versetzt. Das RG wurde bei 35 °C für 20 h gerührt, das LM *in vacuo* entfernt, in DCM aufgenommen und gegen ges. NaHCO₃ und ges. NaCl gewaschen. Die vereinigten Wasserphasen wurden gegen DCM reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*Hex/EtOAc = 15:1) gereinigt um **51** (397 mg, 64%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

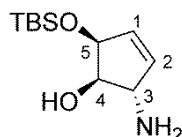
Zu 21% entsteht das nicht-allylisch geschützte TBS-Derivat.^{157,165}

R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:1): 0.25;

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.69 (d, ³*J*_{NH,HC3} = 6.06 Hz, 1H; NH), 5.98 (ddd, ³*J*_{HC1,HC3} = 2.04 Hz, ³*J*_{HC1,HC5} = 4.14 Hz, ³*J*_{HC1,HC2} = 6.12 Hz, 1H; HC1), 5.94 (dd, ³*J*_{HC2,HC3} = 1.92 Hz, ³*J*_{HC2,HC1} = 6.12 Hz, 1H; HC2), 4.77 – 4.72 (m, 2H; HC3, HC4), 4.00 (dd, ³*J*_{HC5,HC1} = 4.50 Hz, ³*J*_{HC5,HC4} = 5.46 Hz, 1H; HC5), 0.92 (s, 9H; (CH₃)₃), 0.15 (s, 3H; SiCH₃), 0.13 ppm (s, 3H; SiCH₃);

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3): δ =161.9 (CO), 135.0 (C1), 133.3 (C2), 76.3 (C5), 74.4 (C4), 63.3 (C3), 25.7 (3C; $\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3$), 18.1 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), -4.3 (SiCH_3), -4.9 ppm (SiCH_3);
IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3305 (w, OH), 2952 (w, CH), 1692 (s, CONH), 1519 (m, NH) und 1081 (m, CHOH);
HRMS (ESI $^-$): ber. für: $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{Si}]^-$ 372.0362, gefunden: 372.0359 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

7.5.6.2 (3*S*,4*R*,5*S*)-4-Hydroxy-5-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-3-amino-cyclopenten (**52**)



Cyclopenten **51** (65 mg, 0.17 mmol, 1 Äq) wurde in methanolischem NH_3 (7 N, 5 mL) gelöst und NH_3 konz. (1 mL) zugegeben. Die Lösung wurde 25 h bei rt gerührt. Das RG wurde in DCM aufgenommen und zweimal gegen Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, infiltriert und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH/TEA = 50:1:0.1) gereinigt um das freie Amin **52** (20 mg, 50%) als farbloses Öl zu erhalten.

R_f (DCM/MeOH = 5:1): 0.22;

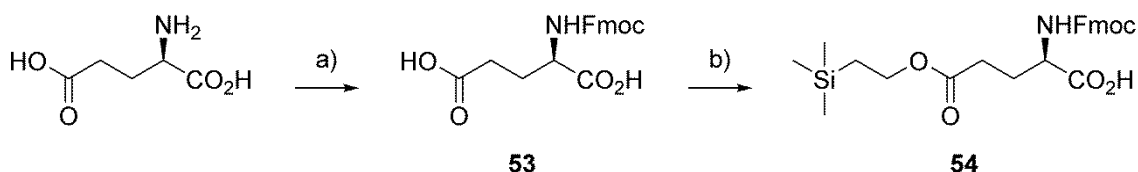
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ =6.15 (dd, $^3J_{\text{HC3,HC2}}$ =1.56 Hz, $^3J_{\text{HC3,HC4}}$ =6.16 Hz, 1H; HC3), 5.76 – 5.99 (m, 1H; HC4), 4.78 (d, $^3J_{\text{HC5,HC1}}$ =5.76 Hz, 1H; HC5), 4.43 – 4.40 (m, 1H; HC1), 4.27 – 4.26 (m, 1H; C2), 0.88 (s, 9H; $(\text{CH}_3)_3$), 0.11 (s, 3H; SiCH_3), 0.10 ppm (s, 3H; SiCH_3);

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ =136.6 (C4), 130.9 (C3), 74.3 (C1), 74.1 (C5), 62.1 (C2), 25.8 (3C; $\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3$), 18.2 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), -4.5 (SiCH_3), -4.8 ppm (SiCH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3397 (m, br, OH), 2927 (s, CH), 1253 (m, NH_2), 1089 (s, CHOH) und 732 (m, $\text{HC}=\text{CH}$ cis);

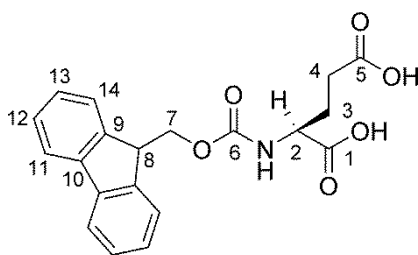
HRMS (ESI $^+$): ber. für: $[\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{NO}_2\text{Si}]^+$ 230.1571, gefunden: 230.1570 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.7 Synthese von Aminosäure **54**



Schema 30: Synthese zu Glutaminsäure **54**. a) Na_2CO_3 , FmocSu, MeCN, rt, 0.5 h, 92%; b) 2-(Trimethylsilyl) ethanol, DMAP, DCC, MeCN, 0 °C, 23 h, 39%.

7.5.7.1 (2*S*)-2(((9*H*-Flouren-9-yl)methoxy)carbamoyl)pentandisäure (**53**)



Eine Na_2CO_3 -Lösung (1.44 g, 13.60 mmol, 2.0 Äq in 52 mL H_2O) wurde mit L-Glutaminsäure (1.00 g, 6.80 mmol, 1.0 Äq) und einer *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid-Lösung (2.75 g, 8.16 mmol, 1.2 Äq in 52 mL MeCN) versetzt. Das RG wurde für 0.5 h bei rt gerührt. Die entstandene Suspension wurde mit 2 M HCl auf pH=5 gebracht und zweimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und ges. NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde aus einem EtOAc/*i*Hex Gemisch (1:1) umkristallisiert, um die Fmoc-geschützte Aminosäure **53** (2.3 g, 92%) zu erhalten.

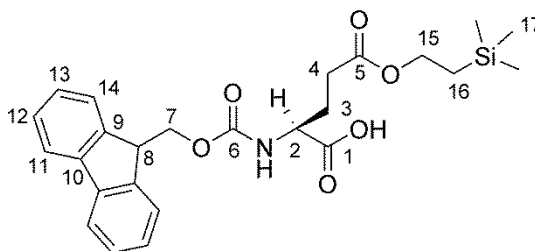
R_f (DCM/MeOH = 4:1): 0.09;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_6 -DMSO): δ =12.43 (s, 2H; COOH), 7.90 (d, $^3J_{\text{HC11},\text{HC12}}$ =7.52 Hz, 2H; HC11), 7.72 (d, $^3J_{\text{HC14},\text{HC13}}$ =7.32 Hz, 2H; HC14), 7.67 (d, $^3J_{\text{NH},\text{HC2}}$ =8.28 Hz, 1H; NH), 7.44 – 7.40 (m 2H; HC12), 7.35 – 7.31 (m, 2H; HC13), 4.29 – 4.21 (m, 3H; HC8, C7H₂), 4.00 – 3.96 (m, 1H; HC2), 2.33 – 2.29 (m, 2H; C4H₂), 2.02 – 1.94 (m, 1H; H_aC3), 1.82 – 1.73 ppm (m, 1H; H_bC3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_6 -DMSO): δ =174.2 (COOH), 174.0 (COOH), 156.6 (C6), 144.2 (C9), 141.1 (C10), 128.1 (C12), 127.5 (C13), 125.7 (C14), 120.6 (C11), 66.1 (C7), 53.4 (C2), 47.1 (C8), 30.6 (C4), 26.5 ppm (C3);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_6]^+$ 370.1285, gefunden: 370.1288 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.5.7.2 (2S)-2(((9H-Flouren-9-yl)methoxy)carbamoyl)-5-oxo-5-(2-(trimethylsilyl)ethoxy)pentandisäure (54)



Aminosäure **53** (1.50 g, 4.07 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeCN abs. (250 mL) gelöst und bei 0 °C mit 2-(Trimethylsilyl)ethanol (0.640 mL, 4.47 mmol, 1.10 Äq.), 4-(Dimethylamino)pyridin (0.50 g, 4.07 mmol, 1.0 Äq.) und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (0.9 g, 4.47 mmol, 1.1 Äq.) versetzt und für 23 h bei 0 °C gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in DCM (150 mL) aufgenommen und mit ges. NaHCO₃ gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit DCM reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 0.1 M HCl gegengewaschen und das LM *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH = 20:1) und Glutaminsäure **54** (0.748 g, 39%) als farbloser Feststoff erhalten.

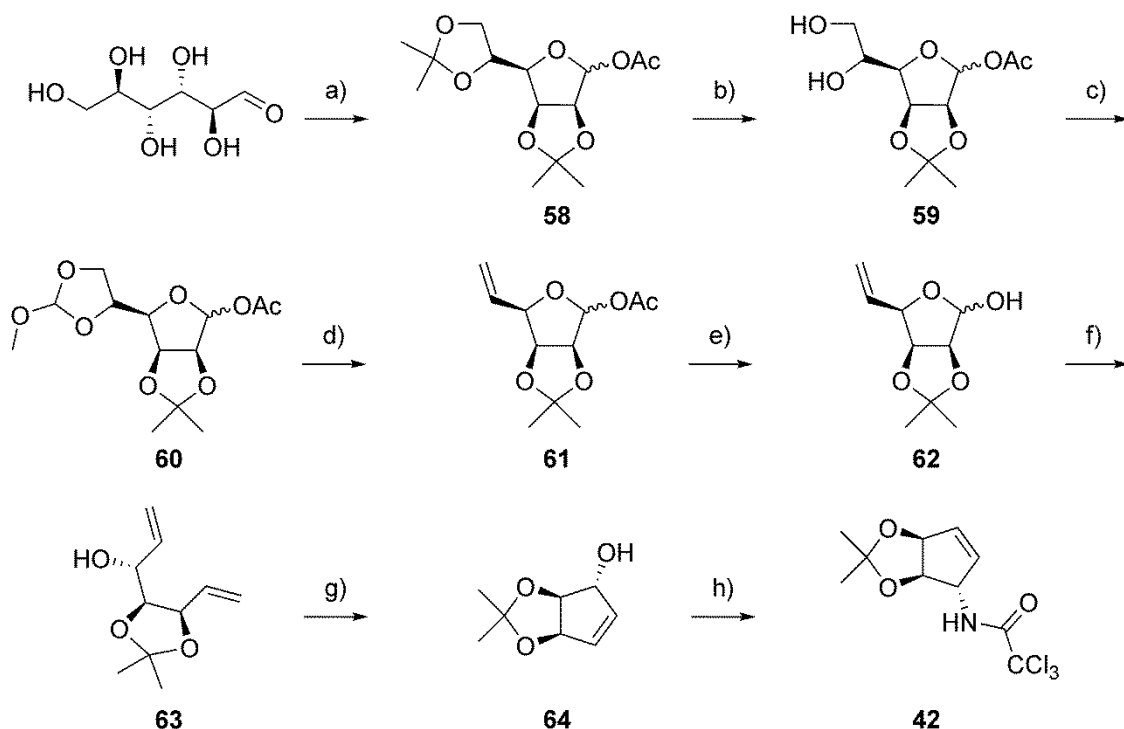
R_f (DCM/MeOH = 4:1): 0.50;

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=7.76 (d, ³J_{HC11,HC12}=7.50 Hz, 2H; HC11), 7.59 (t, ³J_{HC14,HC13}=6.48 Hz, 2H; HC14), 7.41 – 7.38 (m, 2H; HC12), 7.32 – 7.30 (m, 2H; HC13), 5.58 (d, ³J_{NH,HC2}=7.74 Hz, 1H; NH), 4.44 – 4.37 (m, 3H; HC2, C7H₂), 4.22 (t, ³J_{HC8,HC7}=7.02 Hz, 1H; HC8), 4.19 (t, ³J_{HC15,HC16}=7.68 Hz, 2H; C15H₂), 2.53 – 2.40 (m, 2H; HC4), 2.30 – 2.26 (m, 1H; H_aC3), 2.08 – 2.02 (m, 1H; H_bC3), 0.99 (t, 2H, ³J_{HC16,HC15}=8.58 Hz; C16H₂), 0.02 ppm (s, 9H; C17H₃);

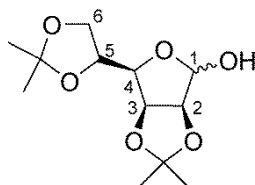
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ=175.4 (COOH), 173.3 (COOH), 156.1 (C6), 143.8 (C9), 141.3 (C10), 127.7 (C12), 127.1 (C13), 125.1 (C14), 120.0 (C11), 67.2 (C7), 63.3 (C15), 53.3 (C2), 47.1 (C8), 30.6 (C4), 27.3 (C3), 17.3 (C16), –1.54 ppm (C17);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2953 (w, CH), 1730 (s, COOH), 1531 (w, NHR₂), 1450 (m, CH₂) und 1250 (s, C(CH₃)₃);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₂₅H₃₁NNaO₆Si]⁺ 492.1813, gefunden: 492.1816 [M+H]⁺.

7.5.8 Synthese von Cyclopenten **42**^{149,155,166,167}

Schema 31: Synthese zu Cyclopenten **42**. a) i) DMP, *p*-TsOH, 80 °C, 4 h; ii) Ac₂O, Pyridin, rt, 18 h; b) AcOH (64%), 55 °C, 3.5 h; c) CH(OMe)₃, 100 °C, 0.5 h; d) Ac₂O, 130 °C, 5 h; e) KOtBu, MeOH, 0 – rt, 5 min, 69% über sechs Stufen; f) NaH, DMSO, PMPPh₃Br, THF, 0 → 65 °C, 6 h, 82%; g) *Grubbs I*, DCM, rt, 24 h, 85%; h) i) Cl₃CCN, DBU, DCM, 0 → rt, 0.2 h, 93%; ii) *o*-Xylol, 150 °C, 5 h, 93%.

7.5.8.1 2,3:5,6-Di-*O*-isopropyliden-mannofuranosid (**68**)

D(+)-Mannose (50.00 g, 0.3 mol, 1.0 Äq) wurde in 2,2-Dimethoxypropan (159 mL, 1.28 mol, 4.6 Äq) suspendiert und auf 60 °C erwärmt. *p*-Toluolsulfonsäure (159 mg, 0.83 mmol, 0.3 mol%) wurde dem RG zugegeben und für 4 h bei 80 °C gerührt. Nachdem das RG auf rt abgekühlt war wurde ges. NaHCO₃ (9 mL) zugegeben, der Niederschlag abfiltriert, das LM *in vacuo* auf die Hälfte eingengt und mit EtOAc versetzt. Es wurde mit ges. NaCl gewaschen, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Es wurde Pentose **68** als 1:4 Gemisch in Form eines farblosen Feststoffes erhalten, welcher direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:4): 0.55;

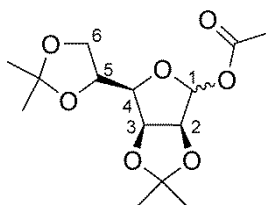
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=5.36 (s, 1H; HC1), 4.81 – 4.77 (m, 1H; HC3), 4.72 – 4.69 (m, 1H; HC2), 4.40 – 4.35 (m, 1H; HC5), 4.18 – 4.00 (m, 3H; HC4, H₂C6), 1.43 (s, 6H; CH₃), 1.36 ppm (s, 6H; CH₃);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=112.6 (C(CH₃)₂), 109.1 (C(CH₃)₂), 101.2 (C1), 85.5 (C2), 80.2 (C4), 79.6 (C3), 73.3 (C5), 66.6 (C6), 26.8 (CH₃), 25.8 (CH₃), 25.2 (CH₃), 24.5 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3351 (w, br, OH), 2936 (w, CH), 1029 (s, COC), 1028 (s, COCH₂OC);

HRMS (ESI⁻): ber. für: [C₁₂H₁₉O₆]⁻ 259.1187, gefunden: 259.1186 [M-H]⁻.

7.5.8.2 1-*O*-Acetyl-2,3:5,6-di-*O*-isopropyliden-mannofuranosid (**58**)



Zucker **67** (74.73 g, 0.29 mol, 1.0 Äq) wurde in Pyridin abs. (57 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Das RG wird mit Essigsäureanhydrid (54 mL, 0.57 mol, 2.0 Äq) versetzt, bei 0 °C für 1 h und weitere 18 h bei rt gerührt. Mit Ethanol (26 mL) wurde das RG *gequencht* und weitere 1.5 h bei rt gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, um Pentose **58** als gelbes Öl zu erhalten, welches ohne weitere Aufarbeitung weiter eingesetzt wurde.

R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:4): 0.64;

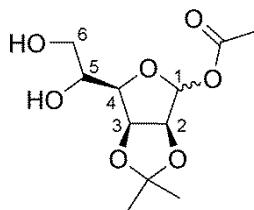
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=6.07 (s, 1H; HC1), 4.82 – 4.79 (m, 1H; HC3), 4.65 (d, ³J_{HC2,HC3}=5.88 Hz, 1H; HC2), 4.38 – 4.32 (m, 1H; HC5), 4.98 – 3.97 (m, 3H; HC4, H₂C6), 2.01 (s, 3H; CH₃), 1.44 (s, 3H; CH₃), 1.38 (s, 3H; CH₃), 1.33 (s, 3H; CH₃), 1.30 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=169.3 (CO), 113.2 (C(CH₃)₂), 109.3 (C(CH₃)₂), 100.8 (C1), 85.0 (C2), 82.2 (C4), 79.3 (C3), 72.9 (C5), 66.8 (C6), 26.9 (CH₃), 25.9 (CH₃), 25.1 (CH₃), 24.6 (CH₃), 21.0 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2989 (w, CH), 1745 (m, CO), 1373 (m, C(CH₃)₃), 1209 (m, C(CH₃)₃), 727 (s, OCO);

MS (EI): ber. für: [C₁₄H₂₃O₇]⁺ 303.3, gefunden: 303.3 [M+H]⁺.

7.5.8.3 1-*O*-Acetyl-2,3-*O*-isopropyliden-mannofuranosid (**59**)



Zucker **58** (82.18 g, 0.27 mol) wurde in Essigsäure (64 %ig, 448 mL) gelöst und bei 55 °C für 3.5 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt. Pentose **59** wurde als gelbes Öl erhalten, welches im nächsten Schritt ohne weitere Aufarbeitung verwendet wurde.

R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:4): 0.16;

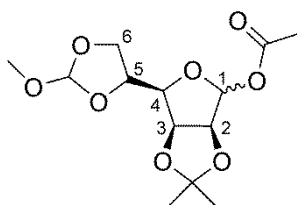
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =6.06 (s, 1H; HC1), 4.88 – 4.85 (m, 1H; HC3), 4.64 (d, 1H, $^3J_{\text{HC2,HC3}}$ =5.82 Hz; HC2), 4.02 – 3.75 (m, 3H; HC4, H₂C6), 3.65 – 3.59 (m, 1H; HC5), 2.00 (s, 3H; CH₃), 1.42 (s, 3H; CH₃), 1.29 ppm (s, 3H; CH₃);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =169.6 (CO), 113.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 100.7 (C1), 84.7 (C2), 81.3 (C4), 79.7 (C3), 69.7 (C5), 64.0 (C6), 25.9 (CH₃), 24.7 (CH₃), 21.0 ppm (CH₃);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =3349 (w, br, OH), 2939 (w, CH), 1741 (m, CO), 1074 (m, COC), 1006 (s, COCH₂OC);

HRMS (ESI⁺): ber. für: $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NaO}_7]^+$ 285.0945, gefunden: 285.0944 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

7.5.8.4 1-*O*-Acetyl-5,6-*O*-methoxymethylen-2,3-*O*-isopropyliden-mannofuranosid (**60**)



Zucker **59** (78.57 g, 0.30 mol, 1.0 Äq) wurde in Trimethylformiat (164 mL, 1.60 mol, 5.0 Äq) gelöst, bei 100 °C für 0.5 h gerührt, um dann das RG auf rt abkühlen zu lassen. Das LM wurde *in vacuo* entfernt, um die vollgeschützte Pentose **60** als Diastereotopengemisch in Form eines gelben Öls zu erhalten, welches ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt wurde.

R_f (*i*Hex/EtOAc = 1:4): 0.54;

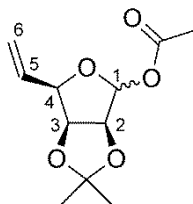
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =6.13 (s, 1H; HC1), 6.12 (s, 1H; HC1), 5.76 (s, 1H; MeO-HC), 5.74 (s, 1H; HC), 4.91 – 4.80 (m, 2H; HC3), 4.69 (d, $^3J_{\text{HC2,HC3}}$ =4.38 Hz, 1H; HC2), 4.68 (d, $^3J_{\text{HC2,HC3}}$ =4.38 Hz, 1H; HC2), 4.50 – 4.39 (m, 2H; HC4), 4.19 – 4.01 (m, 6H; HC5, H₂C6), 3.34 (s, 3H; CH₃), 3.31 (s, 3H; CH₃), 2.05 (s, 6H; CH₃), 1.47 (s, 3H; CH₃), 1.45 (s, 3H; CH₃), 1.33 (s, 3H; CH₃), 1.33 ppm (s, 3H; CH₃);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =169.3 (2C; CO), 116.4 (CHO_3), 115.6 (CHO_3), 113.3 (2C; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 100.9 (C1), 100.7 (C1), 85.0 (2C; C2), 82.6 (C4), 81.5 (C4), 79.5 (C3), 79.1 (C3), 72.8 (CH_3O), 72.7 (CH_3O), 67.1 (C5), 65.7 (C5), 52.2 (C6), 51.7 (C6), 25.9 (CH_3), 25.8 (CH_3), 24.6 (CH_3), 24.5 (CH_3), 21.0 ppm (2C; CH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 2989 (w, CH), 1744 (m, CO), 1072 (s, COC);

HRMS (ESI+): ber. für: $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NaO}_8]^+$ 327.1050, gefunden: 327.1052 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

7.5.8.5 1-O-Acetyl-2,3-O-isopropyliden-4-vinyl- α -D-erythrofuranosid (61)



Zucker **60** (81.58 g, 0.27 mol, 1.0 Äq) wurde in Essigsäureanhydrid (186 mL, 1.98 mol, 7.5 Äq) gelöst und bei 130 °C für 5 h gerührt. Anschließend wurde das RG auf 0 °C gekühlt, mit Ethanol (150 mL) versetzt und weitere 0.15 h bei rt gerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingengt. Das erhaltene schwarz-braunes Öl wurde in EtOAc aufgenommen und zweimal mit ges. NaHCO_3 extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingengt. Das erhaltene Rohprodukt **61** wurde in der folgenden Reaktion ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

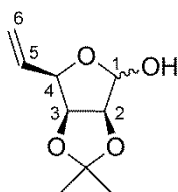
R_f (*i*Hex/EtOAc = 3:1): 0.50;

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =6.14 (s, 1H; HC1), 5.94 – 5.88 (m, 1H; HC5), 5.43 – 5.29 (m, 2H; H_2C_6), 4.75 – 4.73 (m, 1H; HC3), 4.69 – 4.67 (m, 1H; HC2), 4.52 – 4.48 (m, 1H; HC4), 2.04 (s, 3H; CH_3), 1.45 (s, 3H; CH_3), 1.30 ppm (s, 3H; CH_3);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =169.4 (CO), 131.5 (C5), 119.6 (C6), 113.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 100.6 (C1), 85.3 (C2), 82.3 (C4), 81.1 (C3), 26.1 (CH_3), 25.0 (CH_3), 21.0 ppm (CH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 2990 (w, CH), 1745 (m, CO), 1374 (m, CH_3COO), 1227 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1076 (m, COC), 960 (s, C=C);

HRMS (EI): ber. für: $[\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_5]^+$ 228.0998, gefunden: 228.1003 $[\text{M}]^+$.

7.5.8.6 2,3-*O*-Isopropyliden-4-vinylerythrofuranosid (**62**)

Zucker **61** (64.83 g, 0.23 mol, 1.0 Äq) wurde in MeOH (150 mL) gelöst und bei 0 °C portionsweise mit KO^tBu (10.10 g, 0.09 mol, 0.4 Äq) versetzt. Das RG wurde 5 min bei rt gerührt und dann mit Dowex H⁺-Resin HCR-W2 neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wurde *in vacuo* eingeeengt, in ges. NaHCO₃ aufgenommen und zweimal mit EtOAc gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingeeengt. Das erhaltene braune Öl wurde destilliert (T = 110 °C, p = 50 mbar), um Pentose **62** (69% über sechs Stufen) als farbloses Öl zu erhalten.

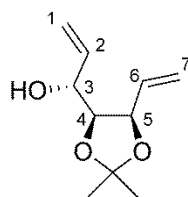
R_f (iHex/EtOAc = 4:1): 0.21;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=6.01 – 5.89 (m, 1H; HC5), 5.41 – 5.28 (m, 2H; H₂C6), 5.36 (s, 1H; HC1), 4.71 – 4.68 (m, 1H; HC3), 4.62 – 4.56 (m, 2H; HC2, HC4), 1.44 (s, 3H; CH₃), 1.29 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=132.1 (C5), 119.2 (C6), 112.6 (C(CH₃)₂), 100.9 (C1), 85.8 (C2), 81.5 (C4), 81.4 (C3), 26.0 (CH₃), 24.8 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3414 (m, br, OH), 3084 (w, C=CH₂), 2987 (m, CH), 2941 (m, CH), 1374 (m, C(CH₃)₂), 1208 (s, C(CH₃)₂), 1058 (s, CHOH), 990 (s, C=CH₂);

HRMS (EI): ber. für: [C₉H₁₄O₄]⁺ 186.0892, gefunden: 186.0869 [M]⁺.

7.5.8.7 (3*R*,4*S*,5*R*)-4,5-*O*-Isopropylidenhepta-1,6-dien-3,4,5-triol (**63**)

Natriumhydrid (12.40 g, 0.52 mol, 4.2 Äq) wurde in THF abs. (500 mL) suspendiert, auf 0 °C gekühlt und langsam mit DMSO abs. (27.5 mL, 0.39 mmol, 3.1 Äq) versetzt. Das RG wurde 0.75 h bei rt gerührt, um dann bei 0 °C Methyltriphenylphosphoniumbromid (92.10 g, 0.26 mol, 2.1 Äq) zuzugeben und weitere 2 h bei rt zu rühren. Anschließend wurde die Lösung von Zucker **62** (23.00 g, 0.12 mol, 1.0 Äq) in THF abs. zugetropft und das Gemisch 3 h bei 65 °C gerührt. Nachdem das RG wieder auf rt abgekühlt war, wurde es in *iso*-Hexan aufgenommen und über Kieselgur filtriert. Das LM wurde *in vacuo* eingeeengt, in MTBE aufgenommen, zweimal mit H₂O extrahiert, die organische Phase reextrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch (iHex/EtOAc = 6:1) gereinigt, um Alkohol **63** (18.8 g, 82%) als farbloses Öl zu erhalten.

R_f (iHex/EtOAc = 6:1): 0.26;

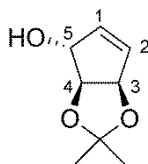
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=6.08 – 5.97 (m, 1H; HC6), 5.91 – 5.80 (m, 1H; HC2), 5.41 – 5.21 (m, 4H; H₂C1, H₂C7), 4.66 – 4.61 (m, 1H; HC5), 4.14 – 4.06 (m, 2H; HC3, HC4), 1.43 (s, 3H; CH₃), 1.40 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=136.8 (C2), 133.9 (C6), 119.4 (C7), 117.0 (C1), 108.8 (C(CH₃)₂), 80.6 (4), 79.0 (5), 70.6 (C3), 27.4 (CH₃), 25.0 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3442 (m, br, OH), 3084 (w, C=CH₂), 2988 (m, CH), 2937 (m, CH), 2886 (m, CH), 1382 (m, C(CH₃)₂), 1216 (s, C(CH₃)₂), 1053 (s, CHOH), 992 (s, C=CH₂), 928 (s, C=CH₂);

HRMS (ESI⁺): ber. für: [C₁₀H₂₀NO₃]⁺ 202.1438, gefunden: 202.1439 [M+NH₄]⁺.

7.5.8.8 (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-Isopropyliden-cyclopent-1-en-3,4,5-triol (**64**)



Unter Luftausschluss wurde Alkohol **63** (3.30 g, 17.91 mmol, 1.0 Äq) in DCM abs. (180 mL) gelöst und mit *Grubbs*-1-Katalysator (73 mg, 0.09 mmol, 0.5 mol%) versetzt. Das RG wurde für 24 h bei rt gerührt. Das LM wurde *in vacuo* eingeeengt und das dunkelbraune Rohprodukt säulenchromatographisch (iHex/EtOAc = 3:1) gereinigt, um Cyclopenten **64** (2.38 g, 85 %) als hellbraunes Öl zu erhalten.

R_f (iHex/EtOAc = 6:4): 0.31;

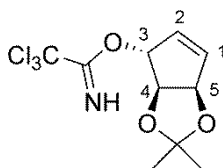
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=6.04 – 6.02 (m, 1H; HC2), 5.92 – 5.90 (m, 1H; HC1), 5.29 – 5.28 (m, 1H; HC3), 4.80 (m, 1H; HC5), 4.53 – 4.52 (m, 1H; HC4), 1.40 (s, 3H; CH₃), 1.35 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ=135.7 (C2), 134.5 (C1), 111.7 (C(CH₃)₂), 85.9 (C4), 84.2 (C3), 81.0 (C5), 27.3 (CH₃), 25.7 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ =3388 (m, br, OH), 3064 (w, C=C), 2988 (m, CH), 2935 (m, CH), 1372 (m, C(CH₃)₂), 1210 (m, C(CH₃)₂), 1038 (s, CHOH);

MS (EI): m/z (%): 157.1 (11).

7.5.8.9 (3*R*,4*R*,5*R*)-3-*O*-Trichloracetimidoyl-4,5-*O*-isopropyliden-cyclopent-1-en-3,4,5-triol (**65**)



Cyclopenten **64** (2.98 g, 19.08 mmol, 1.0 Äq) wurde in DCM abs. (56 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Trichloracetonitril (2.87 mL, 28.60 mmol, 1.5 Äq) und Diazabicycloundecen (3.56 mL, 23.80 mmol, 1.0 Äq) wurden zugegeben. Das RG wurde zunächst 0.1 h bei 0 °C und dann weitere 0.1 h bei rt gerührt. Dem RG wurde ges. NaHCO₃ zugegeben und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (*i*Hex/EtOAc = 10:1) gereinigt, um Cyclopenten **65** (5.33 g, 93 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Sm}: 90 – 92 °C, **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 10:1): 0.42;

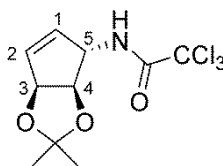
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ= 8.47 (s, 1H; NH), 6.22 – 6.20 (m, 1H; HC2), 6.05 – 6.02 (m, 1H; HC1), 5.76 (s, 1H; HC5), 5.34 – 5.31 (m, 1H; HC4), 4.70 (d, ³J_{HC3,HC4}=5.82 Hz, 1H; HC3), 1.45 (s, 3H; CH₃), 1.38 ppm (s, 3H; CH₃);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ=162.0 (CNO), 138.4 (C2), 130.6 (C1), 112.4 (C(CH₃)₂), 87.6 (C5), 85.9 (CCl₃), 84.0 (C4), 82.8 (C3), 27.3 (CH₃), 25.8 ppm (CH₃);

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3328 (w, CNH), 1948 (w, CH), 1663 (m, CNHO), 1046 (s, C(CH₃)₃), 794 (C=C);

HRMS (ESI⁺): ber. Für: [C₁₀H₁₃NO₃Cl₃]⁺ 299.9956, gefunden: 299.9959 [M+H]⁺.

7.5.8.10 (3*S*,4*R*,5*S*)-5-(*N*-Trichloracetyl-amino)-3,4-*O*-isopropylidencyclopent-1-en-3,4-diol (**42**)



Cyclopenten **65** (4.18 g, 13.91 mmol), wurde in *o*-Xylol (150 mL) gelöst und bei 150 °C für 5 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und das gelbe Öl säulenchromatographisch (*i*Hex/EtOAc = 10:1 → 1:1) gereinigt, um Cyclopenten **42** (3.89 g, 93%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

T_{Sm}: 99 – 101 °C, **R_f** (*i*Hex/EtOAc = 10:1): 0.14;

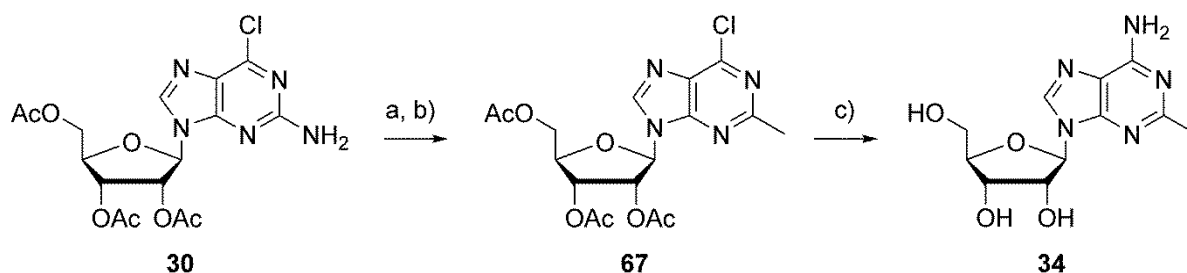
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ=6.58 (s, 1H; NH), 6.15 – 6.13 (m, 1H; HC1), 5.83 – 5.82 (m, 1H; HC2), 5.33 – 5.32 (m, 1H; HC5), 4.85 – 4.83 (m, 1H; HC3), 4.56 (d, ³J_{HC4,HC3}=5.70 Hz, 1H; HC4), 1.44 (s, 3H; CH₃), 1.36 ppm (s, 3H; CH₃);

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3): δ =161.5 (CO), 137.2 (C1), 130.5 (C2), 112.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 92.3 (CCl_3), 84.4 (C5), 83.7 (C4), 63.1 (C3), 27.3 (CH_3), 25.7 ppm (CH_3);

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ =2289 (m, CONH), 2936 (w, CH), 1694 (s, CO), 1513 (s, NHCO), 1372 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1204 (m, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 120 (s, $\text{C}=\text{C}$);

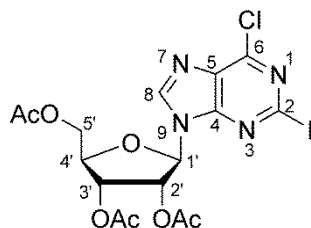
HRMS (ESI $^-$): ber. für $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_4\text{NO}_3]^-$ 333.9577, gefunden: 333.9582 $[\text{MCl}]^-$.

7.6 Synthese von m^2A (**34**)¹⁰⁴



Schema 32: Synthese zu m^2A **34**. a) I_2 , CH_2I_2 , CuI, *N*-Pentylinitrit, THF, 70 °C, 2 h, 57%; b) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_3$, ZnCl_2 , MeMgCl , THF, 0 °C, 3 h, 81%; c) NH_3 , rt, 28 h, 69%.

7.6.1 6-Chlor-2-iod-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-purine (**66**)¹⁶⁸

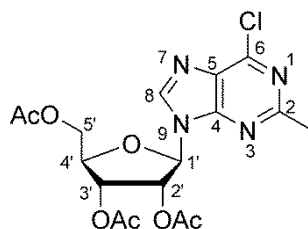


Nukleosid **30** (500 mg, 1.17 mmol, 1.0 Äq), Iod (297 mg, 1.17 mmol, 1.0 Äq), Diiodmethan (0.94 mL, 11.69 mmol, 10.0 Äq) und CuI (223 mg, 1.17 mmol, 1.1 Äq) wurden in THF abs. (5.5 mL) gelöst. *N*-Pentylinitrit (0.47 mL, 3.51 mmol, 3.0 Äq) wurde zugegeben und das RG bei 70 °C für 2 h unter Rückfluss gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 200:1) gereinigt, um Iodnukleosid **66** (358 mg, 57%) als gelben Schaum zu erhalten.

^1H -NMR (200 MHz, D_6 -DMSO): δ =8.81 (s, 1H; HC8), 6.29 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=5.02$ Hz, 1H; HC1'), 5.05 – 6.03 (m, 1H; HC2'), 5.66 – 5.63 (m, 1H; HC3'), 4.43 – 4.24 (m, 3H; HC4', C5'H₂), 2.11 (s, 3H; CH₃), 2.05 (s, 3H; CH₃), 2.01 (s, 3H; CH₃);

HRMS (ESI $^+$): ber. für $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClIN}_4\text{O}_7]^+$ 538.9825, gefunden: 538.9827 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

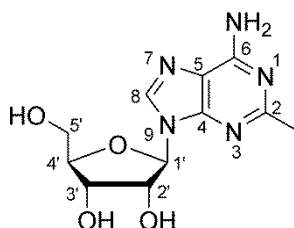
7.6.2 6-Chlor-2-iod-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-purine (67)¹⁶⁹



Nukleosid **66** (100 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq) und $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (22 mg, 0.02 mmol, 0.1 Äq) wurden in THF abs. (1 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. ZnCl_2 (1.0 M in Et_2O , 0.28 mL, 0.28 mmol, 1.5 Äq) wurde auf 0 °C gekühlt und langsam mit MeMgCl (2.56 M in THF, 0.22 mL, 0.56 mmol, 3.0 Äq) versetzt. Die Suspension wurde 3 h bei 0 °C gerührt, anschließend mit THF abs. (1 mL) verdünnt, um sie dann zu der Nukleosidlösung zuzugeben. Das RG wurde 10 min bei 0 °C gerührt und auf rt gebracht, um weitere 2 h zu rühren. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige mit DCM dreimal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl reextrahiert, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das LM *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 200:1) gereinigt, um Nukleosid **67** als farblosen Schaum (64 mg, 81%) zu erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl_3): δ =8.17 (s, 1H; HC8), 6.17 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=5.02$ Hz, 1H; HC1'), 5.97 – 5.93 (m, 1H; HC2'), 5.73 – 5.69 (m, 1H; HC3'), 4.48 – 4.35 (m, 3H; HC4', HaC5', HbC5').

7.6.3 6-Chlor-2-iod-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-purin (34)^{170,171}



Nukleosid **67** (64 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq) wurde mit Ammoniak in einem Druckrohr einkondensiert und für 28 h bei rt gerührt. Ammoniak wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 10:1) gereinigt, um m²A **34** (30 g, 69%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

R_f (DCM/MeOH = 10:1): 0.06;

¹H-NMR (200 MHz, D_2O): δ =8.15 (s, 1H; HC8), 5.93 (d, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=6.24$ Hz, 1H; HC1'), 4.73 (dd, $^3J_{\text{HC1}',\text{HC2}'}=5.22$ Hz, $^3J_{\text{HC1},\text{HC2}}=6.04$ Hz, 1H; HC2'), 4.42 – 4.38 (m 1H; HC3'), 4.30 – 4.26 (m, 1H;

HC4'), 3.93 (dd, $^3J_{\text{Ha5}',\text{HC4}'}=2.62$ Hz, $^3J_{\text{HaC5}',\text{HbC5}'}=13.00$ Hz, 1H; HaC5'), 3.81 ppm (dd, $^3J_{\text{Hb5}',\text{HC4}'}=3.20$ Hz, $^3J_{\text{HbC5}',\text{HaC5}'}=13.00$ Hz, 1H; HbC5');

HRMS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4]^+$ 282.1197, gefunden: 282.1194 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Tabelle 13: Tabelle der Pufferzusammensetzungen für die chromatographischen Anwendungen.

Puffer	Zusammensetzung
A	2 mM HCOONH ₄ in H ₂ O, pH 5.5
B	2 mM HCOONH ₄ in H ₂ O/MeCN 20/80, pH 5.5
C	0.1 M Triethylamin/Essigsäure in H ₂ O
D	0.1 M Triethylamin/Essigsäure in 20% H ₂ O und 80% MeCN
E	0.0085% Ameisensäure in H ₂ O
F	0.0085% Ameisensäure in MeCN

8 Abkürzungsverzeichnis

Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Ar	Aryl (NMR)
ber.	berechnet
br	breit
brsm	basierend auf rückgewonnenes Startmaterial (engl. <i>based on recovered starting materials</i>)
BSA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
Bz	Benzoyl
CDCl ₃	deutiertes Chloroform
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett (NMR)
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett (NMR)
dba	Dibenzylidenaceton
DBU	Diazabicycloundecen
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylanilin
DMAC	Dimethylacetamid
D ₆ -DMSO	deutiertes Dimethylsulfoxid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,2-Dimethoxypropan
Äq	Äquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
f	furanosyl
FaPy	Formamidopyrimidin
FaPy2AN	2,4-Diamino-5-formamidopyrimidin
FaPyA	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin
FaPyDN	2,4,6-Triamino-5-formamidopyrimidin
FaPyG	2,4-Diamino-6-oxo-5-formamidopyrimidin
FaPyHX	4-Amino-6-oxo-5-formamidopyrimidin
FaPyN	4-Amino-5-formamidopyrimidin
FaPyX	4-Amino-2,6-dihydroxy-5-formamidopyrimidin
g	Gramm
ges. NaCl	gesättigte wässrige Natriumchloridlösung
ges. NaHCO ₃	gesättigte wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung
ges. NH ₄ Cl	gesättigte wässrige Ammoniumchloridlösung
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie (engl. <i>high resolution mass spectrometry</i>)
Hz	Herz

<i>i</i> Hex	<i>iso</i> -Hexan
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstanze
konz.	konzentriert
L	Liter
LM	Lösemittel
m	Multiplett (NMR)
m	medium (IR)
M	Molekül
M	molar
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minuten
m	milli
mol	Mol
mRNA	<i>messenger</i> -RNA (Boten-RNA)
N	normal
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
Nr.	Nummer
p	pyranosyl
PivCl	Pivaloylchlorid
ppm	Teile von einer Millionen (engl. <i>part per million</i>)
R _f	Retentionsfaktor
RG	Reaktionsgemisch
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
s	stark (IR)
TBSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TEACl	Tetraethylammoniumchlorid
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TNA	Threosenukleinsäure
tRNA	Transfer-RNA
T _{Sm}	Schmelzpunkt
T _{Zer}	Zersetzungstemperatur
μL	Mikroliter
UV	Ultraviolett
$\tilde{\nu}$	Wellenlänge
w	schwach (IR - engl. <i>weak</i>)

9 Literaturverzeichnis

- 1 Moses. in *Die Bibel - Einheitsübersetzung der Heiligen Schrift - Altes und Neues Testament* (ed im Auftrag der Bischöfe Deutschlands , Österreichs, der Schweiz, des Bischofs von Luxemburg, Lüttich, Bozen-Brixen) Ch. 1, 5 (Paul Pattloch Verlag, 1980).
- 2 Butlerov, A. Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese. *Liebigs Ann. Chem.* **120**, 295–298, (1861).
- 3 Weiss, A. H. und John, T. Homogeneously Catalyzed Formaldehyde Condensation to Carbohydrates III. Concentration Instabilities, Nature of the Catalyst, and Mechanisms. *J. Catal.* **32**, 216-229, (1974).
- 4 Karrer, P. und von Krauss, E. Zur Kenntnis der Formose. *Helv. Chim. Acta* **14**, 820-831, (1931).
- 5 Kusin, A. Über die katalytische Wirkung von Monosen auf die Formaldehyd-Kondensation, III. Mitteil. : Die Zwischenprodukte der Reaktion. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **68**, 2169-2173, (1935).
- 6 Teles, J. H.; Melder, J. P.; Ebel, K.; Schneider, R.; Gehrler, E.; Harder, W.; Brode, S.; Enders, D.; Breuer, K. und Raabe, G. The Chemistry of Stable Carbenes. Part 2. Benzoin-Type Condensations of Formaldehyde Catalyzed by Stable Carbenes. *Helv. Chim. Acta* **79**, 61-83, (1996).
- 7 Breslow, R. On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Lett.*, 22-26, (1959).
- 8 Cannizzaro, S. Ueber den der Benzoësäure entsprechenden Alkohol. *Liebigs Ann. Chem.* **88**, 129-130, (1853).
- 9 Harsch, G.; Bauer, H. und Voelter, W. Kinetik, Katalyse und Mechanismus der Sekundärreaktion in der Schlußphase der Formose-Reaktion. *Liebigs Ann. Chem.*, 623-635, (1984).
- 10 Ricardo, A.; Carrigan, M. A.; Olcott, A. N. und Benner, S. A. Borate minerals stabilize ribose. *Science* **303**, 196-196, (2004).
- 11 Lambert, J. B.; Gurusamy-Thangavelu, S. A. und Ma, K. B. A. The Silicate-Mediated Formose Reaction: Bottom-Up Synthesis of Sugar Silicates. *Science* **327**, 984-986, (2010).
- 12 Kim, H.-J.; Ricardo, A.; Illangkoon, H. I.; Kim, M. J.; Carrigan, M. A.; Frye, F. und Benner, S. A. Synthesis of Carbohydrates in Mineral-Guided Prebiotic Cycles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9457-9468, (2011).
- 13 Gardner, P. M.; Winzer, K. und Davis, B. G. Sugar synthesis in a protocellular model leads to a cell signalling response in bacteria. *Nat. Chem.* **1**, 377-383, (2009).
- 14 Fischer, E. Reduction von Säuren der Zuckergruppe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **22**, 2204-2205, (1889).
- 15 Serianni, A. S.; Clark, E. L. und Barker, R. Carbon-13 Enriched Carbohydrates: Preparation of Erythrose, Threose, Glyceraldehyde and Glycolaldehyde with [13C]-Enrichment in Various Carbon Atoms. *Carbohydr. Res.* **72**, 79-91, (1979).
- 16 Ritson, D. und Sutherland, J. D. Prebiotic synthesis of simple sugars by photoredox systems chemistry. *Nat. Chem.* **4**, 895-899, (2012).
- 17 Müller, D.; Pitsch, S.; Kittaka, A.; Wagner, E.; Wintner, C. E. und Eschenmoser, A. Chemie von alpha-Aminonitrilen - Aldomerisierung von Glycolaldehyd-phosphat zu racemischen Hexose-2,4,6-triphosphaten und (in Gegenwart von Formaldehyd) racemischen Pentose-2,4-diphosphaten: rac-Allose-2,4,6-triphosphat und rac-Ribose-2,4-diphosphat sind die Reaktionshauptprodukte. *Helv. Chim. Acta* **73**, 1410-1468, (1990).
- 18 Löb, W. Über das Verhalten des Formamids unter der Wirkung der stillen Entladung. Ein Beitrag zur Frage der Stickstoff-Assimilation. *Chem. Ber.* **46**, 684-697, (1911).
- 19 Miller, S. L. A Production of Amino Acids under Possible Primitive Earth Conditions. *Science* **117**, 528-529, (1953).
- 20 Miller, S. L. Production of Some Organic Compounds under Possible Primitive Earth Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2351-2361, (1955).

- 21 Johnson, A. P.; Cleaves, H. J.; Dworkin, J. P.; Glavin, D. P.; Lazcano, A. und Bada, J. L. The Miller volcanic spark discharge experiment. *Science* **322**, 404-404, (2008).
- 22 Engel, M. H. und Macko, S. A. Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **389**, 265-268, (1997).
- 23 Epstein, S.; Krishnamurthy, R. V.; Cronin, J. R.; Pizzarello, S. und Yuen, G. U. Unusual stable isotope ratios in amino acid and carboxylic acid extracts from the Murchison meteorite. *Nature* **326**, 477-479, (1987).
- 24 Oró, J.; Gibert, J.; Lichtens, H.; Wikstrom, S. und Flory, D. A. Amino-acids, Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in the Murchison Meteorite. *Nature* **230**, 105-106, (1971).
- 25 Sephton, M. A. Organic compounds in carbonaceous meteorites. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 292-311, (2002).
- 26 Callahan, M. P.; Smith, K. E.; Cleaves, H. J.; Ruzicka, J.; Stern, J. C.; Glavin, D. P.; House, C. H. und Dworkin, J. P. Carbonaceous meteorites contain a wide range of extraterrestrial nucleobases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13995-13998, (2011).
- 27 Fox, S. W. und Harada, K. Synthesis of Uracil under Conditions of a Thermal Model of Prebiological Chemistry. *Science* **133**, 1923-1924, (1961).
- 28 Ferris, J. P.; Sanchez, R. A. und Orgel, L. E. Studies in Prebiotic Synthesis: III. Synthesis of Pyrimidines from Cyanoacetylene and Cyanate. *J. Mol. Biol.* **33**, 693-704, (1968).
- 29 Sanchez, R.; Ferris, J. und Orgel, L. E. Conditions for Purine Synthesis: Did Prebiotic Synthesis Occur at Low Temperatures? *Science* **153**, 72-73, (1966).
- 30 Robertson, M. P. und Miller, S. L. An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. *Nature* **375**, 772-774, (1995).
- 31 Orgel, L. E. Is cyanoacetylene prebiotic? *Orig. Life Evol. Biosph.* **32**, 279-281, (2002).
- 32 Cleaves, H. J.; Nelson, K. E. und Miller, S. L. The prebiotic synthesis of pyrimidines in frozen solution. *Naturwissenschaften* **93**, 228-231, (2006).
- 33 Oró, J. Synthesis of Adenine From Ammonium Cyanide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 407-412, (1960).
- 34 Oró, J. Mechanism of Synthesis of Adenine from Hydrogen Cyanide under possible primitive Earth Conditions. *Nature* **191**, 1193-1194, (1961).
- 35 Basile, B.; Lazcano, A. und Oró, J. Prebiotic Syntheses of Purines and Pyrimidines. *Adv. Space Res.* **4**, 125-131, (1984).
- 36 Brederick, H.; Ulmer, H. und Waldmann, H. Purin aus Formamid. Methylierung und Bromierung des Purins (Synthesen in der Purinreihe, VII. Mitteil. *Chem. Ber.* **89**, 12-18, (1956).
- 37 Barks, H. L.; Buckley, R.; Grieves, G. A.; Di Mauro, E.; Hud, N. V. und Orlando, T. M. Guanine, Adenine, and Hypoxanthine Production in UV-Irradiated Formamide Solutions: Relaxation of the Requirements for Prebiotic Purine Nucleobase Formation. *ChemBioChem* **11**, 1240-1243, (2010).
- 38 Hudson, J. S.; Eberle, J. F.; Vachhani, R. H.; Rogers, L. C.; Wade, J. H.; Krishnamurthy, R. und Springsteen, G. A Unified Mechanism for Abiotic Adenine and Purine Synthesis in Formamide. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 5134-5137, (2012).
- 39 Saladino, R.; Crestini, C.; Ciciriello, F.; Costanzo, G. und Di Mauro, E. Formamide Chemistry and the Origin of Informational Polymers. *Chem. Biodiversity* **4**, 694-720, (2007).
- 40 Saladino, R.; Barontini, M.; Cossetti, C.; Di Mauro, E. und Crestini, C. The Effects of Borate Minerals on the Synthesis of Nucleic Acid Bases, Amino Acids and Biogenic Carboxylic Acids from Formamide. *Orig. Life Evol. Biosph.* **41**, 317-330, (2011).
- 41 Eschenmoser, A. Etiology of Potentially Primordial Biomolecular Structures: From Vitamin B12 to the Nucleic Acids and an Inquiry into the Chemistry of Life's Origin: A Retrospective. *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 12412-12472, (2011).
- 42 Menor-Salvan, C.; Ruiz-Bermejo, D. M.; Guzman, M. I.; Osuna-Esteban, S. und Veintemillas-Verdaguer, S. Synthesis of Pyrimidines and Triazines in Ice: Implications for the Prebiotic Chemistry of Nucleobases. *Chem. Eur. J.* **15**, 4411-4418, (2009).

- 43 Menor-Salvan, C. und Marin-Yaseli, M. R. A New Route for the Prebiotic Synthesis of Nucleobases and Hydantoins in Water/Ice Solutions Involving the Photochemistry of Acetylene. *Chem. Eur. J.* **19**, 6488-6497, (2013).
- 44 Sanchez, R. A. und Orgel, L. E. Studies in Prebiotic Synthesis: V. Synthesis and Photoanomerization of Pyrimidine Nucleosides. *J. Mol. Biol.* **47**, 531-543, (1970).
- 45 Powner, M. W.; Gerland, B. und Sutherland, J. D. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* **459**, 239-242, (2009).
- 46 Fuller, W. D.; Sanchez, R. A. und Orgel, L. E. Studies in Prebiotic Synthesis VI. Synthesis of Purine Nucleosides. *J. Mol. Biol.* **67**, 25-33, (1972).
- 47 Fuller, W. D.; Orgel, L. E. und Sanchez, R. A. Studies in Prebiotic Synthesis.VII. Solid-State Synthesis of Purine Nucleosides. *J. Mol. Evol.* **1**, 249-257, (1972).
- 48 Powner, M. W.; Sutherland, J. D. und Szostak, J. W. Chemoselective Multicomponent One-Pot Assembly of Purine Precursors in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 16677-16688, (2010).
- 49 Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E. und Cech, T. R. Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157, (1982).
- 50 Zaug, A. J. und Cech, T. R. The Intervening Sequence RNA of Tetrahymena Is an Enzyme. *Science* **231**, 470-475, (1986).
- 51 Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N. und Altman, S. The RNA Moiety of Ribonuclease P Is the Catalytic Subunit of the Enzyme. *Cell* **35**, 849-857, (1983).
- 52 Gilbert, W. The RNA world. *Nature* **319**, 618-618, (1986).
- 53 Pitsch, S.; Wendeborn, S.; Jaun, B. und Eschenmoser, A. Why Pentose- and Not Hexose-Nucleic Acids? Part VII. Pyranosyl-RNA ('p-RNA'). *Helv. Chim. Acta* **76**, 2161-2183, (1993).
- 54 Pitsch, S.; Krishnamurthy, R.; Bolli, M.; Wendeborn, S.; Holzner, A.; Minton, M.; Lesueur, C.; Schlönvogt, I.; Jaun, B. und Eschenmoser, A. Pyranosyl-RNA ('p-RNA'): Base-pairing selectivity and potential to replicate. *Helv. Chim. Acta* **78**, 1621-1635, (1995).
- 55 Pitsch, S.; Wendeborn, S.; Krishnamurthy, R.; Holzner, A.; Minton, M.; Bolli, M.; Miculca, C.; Windhab, N.; Micura, R.; Stanek, M.; Jaun, B. und Eschenmoser, A. Pentopyranosyl oligonucleotide systems - 9th communication - The beta-D-ribosepyranosyl-(4' \rightarrow 2')-oligonucleotide system ('pyranosyl-RNA'): Synthesis and resume of base-pairing properties. *Helv. Chim. Acta* **86**, 4270-4363, (2003).
- 56 Schöning, K. U.; Scholz, P.; Guntha, S.; Wu, X.; Krishnamurthy, R. und Eschenmoser, A. Chemical etiology of nucleic acid structure: The alpha-threofuranosyl-(3' \rightarrow 2') oligonucleotide system. *Science* **290**, 1347-1351, (2000).
- 57 Schöning, K. U.; Scholz, P.; Wu, X. L.; Guntha, S.; Delgado, G.; Krishnamurthy, R. und Eschenmoser, A. The alpha-L-Threofuranosyl-(3' \rightarrow 2')-oligonucleotide System ('TNA'): Synthesis and Pairing Properties. *Helv. Chim. Acta* **85**, 4111-4153, (2002).
- 58 Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Seog, K. K.; Norden, B. und Nielsen, P. E. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**, 566-568, (1993).
- 59 Yu, H. Y.; Zhang, S. und Chaput, J. C. Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor. *Nat. Chem.* **4**, 183-187, (2012).
- 60 Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H. und Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **254**, 1497-1500, (1991).
- 61 Nelson, K. E.; Levy, M. und Miller, S. L. Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3868-3871, (2000).
- 62 Leman, L.; Orgel, L. und Ghadiri, M. R. Carbonyl Sulfide-Mediated Prebiotic Formation of Peptides. *Science* **306**, 283-286, (2004).
- 63 Joshi, P. C. und Aldersley, M. F. Significance of Mineral Salts in Prebiotic RNA Synthesis Catalyzed by Montmorillonite. *J. Mol. Evol.* **76**, 371-379, (2013).

- 64 Ferris, J. P. und Ertem, G. Oligomerization of Ribonucleotides on Montmorillonite: Reaction of the 5'-Phosphorimidazolid of Adenosine. *Science* **257**, 1387-1389, (1992).
- 65 Hernandez, A. R. und Piccirilli, J. A. Chemical Origins of Life: Prebiotic RNA unstuck. *Nat. Chem.* **5**, 360-362, (2013).
- 66 Engelhart, A. E.; Powner, M. W. und Szostak, J. W. Functional RNAs exhibit tolerance for non-heritable 2'-5' versus 3'-5' backbone heterogeneity. *Nat. Chem.* **5**, 390-394, (2013).
- 67 Bowler, F. R.; Chan, C. K. W.; Duffy, C. D.; Gerland, B.; Islam, S.; Powner, M. W.; Sutherland, J. D. und Xu, J. F. Prebiotically plausible oligoribonucleotide ligation facilitated by chemoselective acetylation. *Nat. Chem.* **5**, 383-389, (2013).
- 68 Rammler, D. H.; Khorana, H. G. und Lapidot, Y. Studies on Polynucleotides. XIX. The Specific Synthesis of C3'-C5' Inter-ribonucleotidic Linkage. A New Approach and its Use in the Synthesis of C3'-C5'-Linked Uridine Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1989-1997, (1963).
- 69 Chen, M. C.; Cafferty, B. J.; Mamajanov, I.; Gállego, I.; Khanam, J.; Krishnamurthy, R. und Hud, N. V. Spontaneous Prebiotic Formation of a β -Ribofuranoside That Self-Assembles with a Complementary Heterocycle. *J. Am. Chem. Soc.*, (2014).
- 70 Saladino, R.; Ciambecchini, U.; Crestini, C.; Costanzo, G.; Negri, R. und Di Mauro, E. One-pot TiO₂-catalyzed synthesis of nucleic bases and acyclonucleosides from formamide: Implications for the origin of life. *ChemBioChem* **4**, 514-521, (2003).
- 71 Land, E. J. und Swallow, A. J. One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. 2. Riboflavin. *Biochemistry* **8**, 2117-2125, (1969).
- 72 Mori, T.; Tano, K.; Takimoto, K. und Utsumi, H. Formation of 8-Hydroxyguanine and 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine in DNA by Riboflavin Mediated Photosensitization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 98-101, (1998).
- 73 Keefe, A. D. und Miller, S. L. Are Polyphosphates or Phosphate Esters Prebiotic Reagents? *J. Mol. Evol.* **41**, 693-702, (1995).
- 74 Stemmler, I.; Wagner, K.; Schneider, G. und Ziemann, H. Process for the preparation of polyalcohols and process for the Manufacture of polyurethanes using these polyalcohols. EP 0007101 A1 (1980).
- 75 Loakes, D. The applications of universal DNA base analogues. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2437-2447, (2001).
- 76 Lazcano, A. und Miller, S. L. The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* **85**, 793-798, (1996).
- 77 Farajollahi, S. und Maas, S. Molecular diversity through RNA editing: a balancing act. *Trends Genet.* **26**, 221-230, (2010).
- 78 Deutsch, A. *Synthese von Purin-Nukleosiden unter abiotischen Bedingungen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, (2012).
- 79 Bonicel, A.; Mariaggi, N.; Hughes, E. und Teoule, R. In Vitro Gamma-Irradiation of DNA: Identification of Radioinduced Chemical Modifications of the Adenine Moiety. *Radiat. Res.* **83**, 19-26, (1980).
- 80 Burgdorf, L. T. und Carell, T. Synthesis, stability, and conformation of the formamidopyrimidine G DNA lesion. *Chem. Eur. J.* **8**, 293-301, (2002).
- 81 Cavalieri, L. F.; Tinker, J. F. und Bendich, A. A Synthesis of Adenine. The Incorporation of Isotopes of Nitrogen and Carbon. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 533-536, (1949).
- 82 Pfeleiderer, W. Untersuchungen in der Pyrimidinreihe, III. Über die Darstellung von 4.5-Diamino-Pyrimidinen. *Chem. Ber.* **90**, 2272-2276, (1957).
- 83 Thalhammer, F. und Graefe, J. Process for the preparation of 5-formylaminopyrimidines. US 5648490 (1997).
- 84 Zinner, H. Die Acetate der D-Ribose. *Chem. Ber.* **86**, 817-824, (1953).
- 85 Niedball, U. und Vorbrüggen, H. Synthesis of Nucleosides. 3. A General Synthesis of Pyrimidine Nucleosides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **9**, 461-&, (1970).

- 86 Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K. und Bennua, B. Nucleoside Syntheses. 22. Nucleoside Synthesis with Trimethylsilyl Triflate and Perchlorate as Catalysts. *Chem. Ber.* **114**, 1234-1255, (1981).
- 87 Choi, W. B.; Wilson, L. J.; Yeola, S.; Liotta, D. C. und Schinazi, R. F. In situ complexation directs the stereochemistry of N-glycosylation in the synthesis of thialanyl and dioxolanyl nucleoside analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9377–9379, (1991).
- 88 Pulido, D.; Sanchez, A.; Robles, J.; Pedroso, E. und Grandas, A. Guanine-Containing DNA Minor-Groove Binders. *Eur. J. Org. Chem.*, 1398-1406, (2009).
- 89 Robins, M. J. und Uznanski, B. Nucleic-Acid Related-Compounds. 33. Conversions of Adenosine and Guanosine to 2,6-Dichloro, 2-Amino-6-Chloro, and Derived Purine Nucleosides. *Can. J. Chem.* **59**, 2601-2607, (1981).
- 90 Brown, G. B. und Weliky, V. S. The Synthesis of F 9-beta-D-Ribofuranosylpurine and the Identity of Nebularine. *J. Biol. Chem.* **204**, 1019-1023, (1953).
- 91 Wächtershäuser, G. Evolution of the first metabolic cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 200-204, (1990).
- 92 Avery, O. T.; MacLeod, C. M. und McCarty, M. Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137-158, (1944).
- 93 Dahm, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum. Genet.* **122**, 565-581, (2008).
- 94 Hud, N. V.; Cafferty, B. J.; Krishnamurthy, R. und Williams, L. D. The Origin of RNA and "My Grandfather's Axe". *Chem. Biol.* **20**, 466-474, (2013).
- 95 Watson, J. D. und Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738, (1953).
- 96 Watson, J. D. und Crick, F. H. C. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **171**, 964-967, (1953).
- 97 Carell, T.; Brandmayr, C.; Hienzs, A.; Mueller, M.; Pearson, D.; Reiter, V.; Thoma, I.; Thumbs, P. und Wagner, M. Structure and Function of Noncanonical Nucleobases. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 7110-7131, (2012).
- 98 Motorin, Y. und Helm, M. RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 611-631, (2011).
- 99 Woese, C. R.; Kandler, O. und Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4576-4579, (1990).
- 100 Phizicky, E. M. und Hopper, A. K. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* **24**, 1832-1860, (2010).
- 101 Motorin, Y. und Helm, M. tRNA Stabilization by Modified Nucleotides. *Biochemistry* **49**, 4934-4944, (2010).
- 102 Gustilo, E. M.; Vendeix, F. A. P. und Agris, P. F. tRNA's modifications bring order to gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 134-140, (2008).
- 103 Dalluge, J. J.; Hashizume, T. und McCloskey, J. A. Quantitative measurement of dihydrouridine in RNA using isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS). *Nucleic Acids Res.* **24**, 3242-3245, (1996).
- 104 Brueckl, T. *Synthesis of natural and isotope-labeled tRNA nucleosides and their mass spectrometric quantification*, Ludwig-Maximilians Universität München, (2010).
- 105 Taucher, M. und Breuker, K. Characterization of Modified RNA by Top-Down Mass Spectrometry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 11289-11292, (2012).
- 106 Addepalli, B. und Limbach, P. A. Mass Spectrometry-Based Quantification of Pseudouridine in RNA. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1363-1372, (2011).

- 107 Globisch, D.; Pearson, D.; Hienzsch, A.; Brueckl, T.; Wagner, M.; Thoma, I.; Thumbs, P.; Reiter, V.; Kneuttinger, A. C.; Mueller, M.; Sieber, S. A. und Carell, T. Systems-Based Analysis of Modified tRNA Bases. *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 9739-9742, (2011).
- 108 Brandmayr, C.; Wagner, M.; Brueckl, T.; Globisch, D.; Pearson, D.; Kneuttinger, A. C.; Reiter, V.; Hienzsch, A.; Koch, S.; Thoma, I.; Thumbs, P.; Michalakakis, S.; Mueller, M.; Biel, M. und Carell, T. Isotope-Based Analysis of Modified tRNA Nucleosides Correlates Modification Density with Translational Efficiency. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 11162-11165, (2012).
- 109 Ikeuchi, Y.; Kimura, S.; Numata, T.; Nakamura, D.; Yokogawa, T.; Ogata, T.; Wada, T.; Suzuki, T. und Suzuki, T. Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 277-282, (2010).
- 110 Mandal, D.; Koehrer, C.; Su, D.; Russell, S. P.; Krivos, K.; Castleberry, C. M.; Blum, P.; Limbach, P. A.; Soell, D. und RajBhandary, U. L. Agmatidine, a modified cytidine in the anticodon of archaeal tRNA(Ile), base pairs with adenosine but not with guanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2872-2877, (2010).
- 111 Blaise, M.; Becker, H. D.; Keith, G.; Cambillau, C.; Lapointe, J.; Giege, R. und Kern, D. A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA(Asp) QUC anticodon. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2768-2775, (2004).
- 112 Salazar, J. C.; Ambrogelly, A.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A. und Soll, D. A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7536-7541, (2004).
- 113 Cantara, W. A.; Crain, P. F.; Rozenski, J.; McCloskey, J. A.; Harris, K. A.; Zhang, X. N.; Vendeix, F. A. P.; Fabris, D. und Agris, P. F. The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* **39**, D195-D201, (2011).
- 114 Briand, C.; Poterszman, A.; Eiler, S.; Webster, G.; Thierry, J. C. und Moras, D. An Intermediate Step in the Recognition of tRNA(Asp) by Aspartyl-tRNA Synthetase. *J. Mol. Biol.* **299**, 1051-1060, (2000).
- 115 Thoma, I. und Carell, T. Total Synthesis of the Hypermodified tRNA Nucleoside Epoxyqueuosine. *Eur. J. Org. Chem.*, 4483-4485, (2013).
- 116 Crick, F. H. C. Codon-Anticodon Pairing - The Wobble Hypothesis. *J. Mol. Biol.* **19**, 548-555, (1966).
- 117 Crick, F. H. C. The Origin of the Genetic Code. *J. Mol. Biol.* **38**, 367-379, (1968).
- 118 Agris, P. F.; Vendeix, F. A. P. und Graham, W. D. tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. *J. Mol. Biol.* **366**, 1-13, (2007).
- 119 Meier, F.; Suter, B.; Grosjean, H.; Keith, G. und Kubli, E. Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences 'in vivo' decoding properties. *EMBO J.* **4**, 823-827, (1985).
- 120 Iwata-Reuyl, D. Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. *Bioorg. Chem.* **31**, 24-43, (2003).
- 121 Goodman, H. M.; Abelson, J.; Landy, A.; Brenner, S. und Smith, J. D. Amber Suppression: a Nucleotide Change in the Anticodon of a Tyrosine Transfer RNA. *Nature* **217**, 1019-1024, (1968).
- 122 Harada, F. und Nishimura, S. Possible Anticodon Sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, and tRNA^{Asp} from Escherichia coli. Universal Presence of Nucleoside O in the First Position of the Anticodons of These Transfer Ribonucleic Acid. *Biochemistry* **11**, 301-308, (1972).
- 123 Kasai, H.; Ohashi, Z.; Harada, F.; Nishimura, S.; Oppenheimer, N. J.; Crain, P. F.; Liehr, J. G.; Minden, D. L. V. und McCloskey, J. A. Structure of the Modified Nucleoside Q Isolated from Escherichia coli Transfer Ribonucleic Acid. 7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine. *Biochemistry* **14**, 4198-4208, (1975).
- 124 Shindookada, N.; Okada, N.; Ohgi, T.; Goto, T. und Nishimura, S. Transfer Ribonucleic Acid Guanine Transglycosylase Isolated from Rat Liver. *Biochemistry* **19**, 395-400, (1980).
- 125 Garcia, G. A. und Kittendorf, J. D. Transglycosylation: A mechanism for RNA modification (and editing?). *Bioorg. Chem.* **33**, 229-251, (2005).

- 126 Stengl, B.; Reuter, K. und Klebe, G. Mechanism and Substrate Specificity of tRNA-Guanine Transglycosylases (TGTs): tRNA-Modifying Enzymes from the Three Different Kingdoms of Life Share a Common Catalytic Mechanism. *ChemBioChem* **6**, 1926-1939, (2005).
- 127 Slany, R. K.; Bosl, M.; Crain, P. F. und Kersten, H. A New Function of S-Adenosylmethionine: The Ribosyl Moiety of AdoMet is the Precursor of the Cyclopentenediol Moiety of the tRNA Wobble Base Queuine. *Biochemistry* **32**, 7811-7817, (1993).
- 128 Phillipson, D. W.; Edmonds, C. G.; Crain, P. F.; Smith, D. L.; Davis, D. R. und McCloskey, J. A. Isolation and structure elucidation of an epoxide derivative of the hypermodified nucleoside queuosine from Escherichia coli transfer RNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 3462-3471, (1987).
- 129 Kinzie, S. D.; Thern, B. und Iwata-Reuyl, D. Mechanistic studies of the tRNA-modifying enzyme QueA: A chemical imperative for the use of AdoMet as a "ribosyl" donor. *Org. Lett.* **2**, 1307-1310, (2000).
- 130 Frey, B.; McCloskey, J.; Kersten, W. und Kersten, H. New Function of Vitamin B12: Cobamide-Dependent Reduction of Epoxyqueuosine to Queuosine in tRNAs of Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium. *J. Bacteriol.* **170**, 2078-2082, (1988).
- 131 Miles, Z. D.; McCarty, R. M.; Molnar, G. und Bandarian, V. Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7368-7372, (2011).
- 132 Kasai, H.; Nakanishi, K.; Macfarlane, R. D.; Torgerson, D. F.; Ohashi, Z.; McCloskey, J. A.; Gross, H. J. und Nishimura, S. The Structure of Q* Nucleoside Isolated from Rabbit Liver Transfer Ribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5044-5046, (1976).
- 133 Okada, N. und Nishimura, S. Enzymatic synthesis of Q* nucleoside containing mannose in the anticodon of tRNA: isolation of a novel mannosyltransferase from a cell-free extract of rat liver. *Nucleic Acids Res.* **4**, 2931-2937, (1977).
- 134 Blaise, M.; Olieric, V.; Sauter, C.; Lorber, B.; Roy, B.; Karmakar, S.; Banerjee, R.; Becker, H. D. und Kern, D. Crystal Structure of Glutamyl-Queuosine tRNA(Asp) Synthetase Complexed with L-Glutamate: Structural Elements Mediating tRNA-Independent Activation of Glutamate and Glutamylation of tRNA(Asp) Anticodon. *J. Mol. Biol.* **381**, 1224-1237, (2008).
- 135 Caballero, V. C.; Toledo, V. P.; Maturana, C.; Fisher, C. R.; Payne, S. M. und Salazar, J. C. Expression of Shigella flexneri gluQ-rs gene is linked to dksA and controlled by a transcriptional terminator. *BMC Microbiology* **12**, (2012).
- 136 Okada, N.; Noguchi, S.; Nishimura, S.; Ohgi, T.; Goto, T.; Crain, P. F. und McCloskey, J. A. Structure determination of a nucleoside Q precursor isolated from E. coli tRNA: 7-(aminomethyl)-7-deazaguanosine. *Nucleic Acids Res.* **5**, 2289-2296, (1978).
- 137 Huang, B. S.; Wu, R. T. und Chien, K. Y. Relationship of the Queuine Content of Transfer Ribonucleic Acids to Histopathological Grading and Survival in Human Lung Cancer. *Cancer Res.* **52**, 4696-4700, (1992).
- 138 Ishiwata, S.; Katayama, J.; Shindo, H.; Ozawa, Y.; Itoh, K. und Mizugaki, M. Increased Expression of Queuosine Synthesizing Enzyme, tRNA-Guanine Transglycosylase, and Queuosine Levels in tRNA of Leukemic Cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **129**, 13-17, (2001).
- 139 Rakovich, T.; Boland, C.; Bernstein, I.; Chikwana, V. M.; Iwata-Reuyl, D. und Kelly, V. P. Queuosine Deficiency in Eukaryotes Compromises Tyrosine Production through Increased Tetrahydrobiopterin Oxidation. *J. Mol. Biol.* **286**, 19354-19363, (2011).
- 140 Pathak, C.; Jaiswal, Y. K. und Vinayak, M. Queuine promotes antioxidant defence system by activating cellular antioxidant enzyme activities in cancer. *Biosci. Rep.* **28**, 73-81, (2008).
- 141 Klepper, F.; Jahn, E.-M.; Hickmann, V. und Carell, T. Synthesis of the transfer-RNA nucleoside queuosine by using a chiral allyl azide intermediate. *Angew. Chem., Int. Ed.* **46**, 2325-2327, (2007).
- 142 Brooks, A. F.; Garcia, G. A. und Showalter, H. D. H. A short, concise synthesis of queuine. *Tetrahedron Lett.* **51**, 4163-4165, (2010).
- 143 Ohgi, T.; Kondo, T. und Goto, T. Total synthesis of nucleoside Q. *Tetrahedron Lett.* **46**, 4051-4054, (1977).

- 144 Brueckl, T.; Klepper, F.; Gutschmiedl, K. und Carell, T. A short and efficient synthesis of the tRNA nucleosides PreQ(0) and archaeosine. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 3821-3825, (2007).
- 145 Brueckl, T.; Thoma, I.; Wagner, A. J.; Knochel, P. und Carell, T. Efficient Synthesis of Deazaguanosine-Derived tRNA Nucleosides PreQ(0), PreQ(1), and Archaeosine Using the Turbo-Grignard Method. *Eur. J. Org. Chem.*, 6517-6519, (2010).
- 146 Seela, F. und Hasselmann, D. Synthese von 2-Amino-3,7-dihydro-7-(P-D-ribofuranosyl)-4H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on-7-Desazaguanosin-der Stammverbindung des Nucleosids Q. *Chem. Ber.* **114**, 3395-3402, (1981).
- 147 Payne, G. B. Epoxide Migrations with Alpha,Beta-Epoxy Alcohols. *J. Org. Chem.* **27**, 3819-3822, (1962).
- 148 Seela, F. und Peng, X. H. 7-Functionalized 7-Deazapurine Ribonucleosides Related to 2-Aminoadenosine, Guanosine, and Xanthosine: Glycosylation of Pyrrolo 2,3-d Pyrimidines with 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranose. *J. Org. Chem.* **71**, 81-90, (2006).
- 149 Thoma, I. *Totalsynthese eines isotoopenmarkierten Derivates des hypermodifizierten tRNA Nukleosids Queuosin (Q)*, Ludwig-Maximilians-Universität München, (2009).
- 150 Neidhard, F. C.; Bloch, P. L. und Smith, D. F. Culture Medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**, 736-747, (1974).
- 151 Kondo, T.; Okamoto, K.; Ohgi, T. und Goto, T. Syntheses of hypermodified nucleoside q, and its biosynthetic precursors preq0 and preq1. *Tetrahedron* **42**, 207-213, (1986).
- 152 Cheng, C. S.; Hoops, G. C.; Earl, R. A. und Townsend, L. B. Synthesis of pyrrolo 2,3-d pyrimidines that are structurally related to methylated guanosines from tRNA and the nucleoside Q analogs, PreQ(0) and PreQ(1). *Nucleosides Nucleotides* **16**, 347-364, (1997).
- 153 Nose, A. und Kudo, T. Reduction with Sodium Borohydride-Transition Metal Salt Systems.1. Reduction of Aromatic Nitro-Compounds with the Sodium Borohydride-Nickelous Chloride System. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 1159-1161, (1981).
- 154 Ipaktschi, J. Reduktion von Oximen mit Natriumborant in Gegenwart von Übergangsmetallverbindungen. *Chem. Ber.* **117**, 856-858, (1984).
- 155 Ova, H.; Codee, J. D. C.; Lastdrager, B.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. und van Boom, J. H. A stereoselective and efficient route to (3S,4R,5S)-(+)-4,5-dihydroxycyclopent-1-en-3-ylamine: The side chain of the hypermodified nucleoside Q. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7987-7990, (1998).
- 156 Bourquin, C. unveröffentlichte Ergebnisse.
- 157 Thumbs, P. *Synthese der natürlichen tRNA-Modifikation Galaktosylqueuosin und Untersuchungen zur Struktur der natürlichen tRNA-Modifikation Mannosylqueuosin*, Ludwig-Maximilians Universität München, (2013).
- 158 Brueckl, T.; Globisch, D.; Wagner, M.; Mueller, M. und Carell, T. Parallel Isotope-Based Quantification of Modified tRNA Nucleosides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **48**, 7932-7934, (2009).
- 159 Pfaffeneder, T.; Hackner, B.; Truss, M.; Muenzel, M.; Mueller, M.; Deiml, C. A.; Hagemeier, C. und Carell, T. The Discovery of 5-Formylcytosine in Embryonic Stem Cell DNA. *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 7008-7012, (2011).
- 160 Gacem, B. und Gérard, J. Esterification of sterically hindered acids and alcohols in fluorous media. *Tetrahedron Lett.* **44**, 1391-1393, (2003).
- 161 Dhimitruka, I. und SantaLucia, J. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method. *Org. Lett.* **8**, 47-50, (2006).
- 162 Neises, B. und Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **17**, 522-524, (1978).
- 163 Chen, C.-T. und Munot, Y. S. Direct Atom-Efficient Esterification between Carboxylic Acids and Alcohols Catalyzed by Amphoteric, Water-Tolerant TiO(acac)₂. *J. Org. Chem.* **70**, 8625-8627, (2005).

- 164 Coburn, W. C.; Thorpe, M. C.; Montgome, J. A. und Hewson, K. Correlation of the Proton Magnetic Resonance Chemical Shifts of Substituted Purines with Reactivity Parameters. II. 6-Substituted Purines. *J. Org. Chem.* **30**, 1114-1117, (1965).
- 165 Hickmann, V. *5Ring Synthese Verbesserung*, Ludwig-Maximilians-Universität München, (2006).
- 166 Vonlanthen, D. und Leumann, C. J. Hydroxycyclopentanone Derivatives from D-Mannose via Ring Closing Metathesis: An Improved Synthesis of a Key Intermediate of Tricyclo-DNA. *Synthesis*, 1087-1090, (2003).
- 167 Ovaa, H.; Lastdrager, B.; Codee, J. D. C.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. und van Boom, J. H. A flexible synthesis of cyclopentitol derivatives based on ring-closing metathesis of carbohydrate-derivatived 1,6-dienes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 2370-2377, (2002).
- 168 Matsuda, A.; Shinozaki, M.; Yamaguchi, T.; Homma, H.; Nomoto, R.; Miyasaka, T.; Watanabe, Y. und Abiru, T. Nucleosides and Nucleotides. 103. 2-Alkynyladenosines: A Novel Class of Selective Adenosine A2 Receptor Agonists with Potent Antihypertensive Effects? *J. Med. Chem.* **35**, 241-252, (1992).
- 169 Yamazaki, A.; Furukawa, T.; Akiyama, M.; Okutsu, M.; Kumashir.I und Ikehara, M. Synthesis of Thioinosine and Thio-AICA-riboside Analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 692-696, (1973).
- 170 Davoll, J. und Lowy, B. A. Some Synthetic Analogs of the Natural Purine Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1563-1566, (1952).
- 171 Yamazaki, A.; Kumashir.I und Takenish.T. Synthesis of 2-Methyladenosine and Its 5'-Phosphate. *J. Org. Chem.* **33**, 2583-2586, (1968).